

**Funktionelle Charakterisierung der humanen MPT-
Synthase Sulfurase MOCS3 in der Molybdän-Kofaktor
Synthese: Untersuchungen zur physiologischen Funktion
eines Rhodanese-ähnlichen Proteins im Menschen**

**Von dem Fachbereich für Biowissenschaften und Psychologie
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)**

**genehmigte
Dissertation**

**von Andreas Matthies
aus Asendorf**

**1. Referent: Prof. Dr. S. Leimkühler
2. Referent: Prof. Dr. Ralf-R. Mendel
eingereicht am: 14.07.2005
mündliche Prüfung am: 28.06.2005**

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung des Fachbereiches Biowissenschaften und Psychologie, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgendem Beitrag vorab veröffentlicht:

Publikationen:

Matthies, A., Rajagopalan, K.V., Mendel, R.R., Leimkühler, S. Evidence for the physiological role of a rhodanese-like protein for the biosynthesis of the molybdenum cofactor in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 5946–5951 (2004)

Matthies, A., Nimtz, M., Leimkühler, S. Molybdenum cofactor biosynthesis in humans: Identification of a persulfide-group in the rhodanese-like domain of MOCS3 by mass spectrometry. *Biochemistry*, 44, 7912-7920 (2005)

Tagungsbeiträge:

Matthies, A., Mendel, R.R., Leimkühler, S. The sulfur transfer pathway for the generation of the dithiolene moiety of molybtopterin in humans possibly occurs in an IscS independent manner. Fe/S proteins: Biogenesis, Structure, Function, Pathogenesis and Evolution, Philipps Universität Marburg, 11-14 Sept. 2002

Matthies, A., Mendel, R.R., and Leimkühler, S. MOCS3, involved in molybdenum cofactor biosynthesis in humans, is a zinc-containing protein sharing homologies to ubiquitin-activating enzymes and rhodanases. FASEB Summer Research Conference on Trace Element Metabolism: Integrating Basic and Applied Research. June 26-July 1, 2004, Snowmass Village, Colorado

Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
amp	Ampicilin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-Triphosphat, Adenosin-Monophosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
BCIP	5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat-p-Toluidin-Salz
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
bp	Basenpaare
C	Cytosin
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA („complementary“ DNA)
Da	Dalton
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
ddNTP	didesoxy- Nukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-AD	DNA-Aktivierungsdomäne
DNA-BD	DNA-Bindungsdomäne
DNAse	Desoxynuklease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol

FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
G	Guanin
g, mg, µg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm
GTP, GMP	Guanosin-Triphosphat, Guanosin-Monophosphat
h	Stunde
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethan-sulfonsäure)
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IgG	Immunoglobulin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LB	Luria Broth
m, cm, µm, nm	Meter, Millimeter, Mikrometer, Nanometer
M, mM, µM, nM	molar, millimolar, mikromolar, nanomolar
mA	Milliampere
mol, mmol, µmol,	Mol, Millimol, Mikromol,
nmol, pmol	Nanomol, Pikomol
min	Minute
mind.	mindestens
MeOH	Methanol
Mo	Molybdän
Moco	Molybdäncofaktor
MPT	Molybdopterin
MW	Molekulargewicht
N	Stickstoff
NAD(P)H	Nicotinadenindinucleotid(phosphat) reduziert
NaP _i	Natrium-Phosphate
NBT	Nitro-Blue-Tetrazolium
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
P	Phosphat

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
psi	pound per square inch (nicht metrisches Maß für Druck)
PVDF	Polyvinylidon-Difluorid
QAE	N,N-Diethyl-N(2-hydroxy-1-propyl)-aminoethyl-Gruppen
RLD	rhodanese-like domain
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Schwefel
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolette Licht
V, mV	Volt, Millivolt
v/v	Volumen-zu-Volumen-Verhältnis
Vol.	Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

Abkürzungen für Artnamen

<i>A. nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. vinelandii</i>	<i>Azotobacter vinelandii</i>
<i>B. taurus</i>	<i>Bos taurus</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>H. sapien</i>	<i>Homo sapiens</i>
<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
<i>M. tuberculosum</i>	<i>Mycobakterium tuberculosum</i>
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
<i>R. norvegicus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Molybdän im biologischen System	1
1.2	Die Biosynthese des Molybdäncofaktors.....	3
1.3	Humane Molybdäncofaktor-Defizienz.....	7
1.4	Der zweite Schritt der Moco-Biosynthese.....	8
1.5	Die Familie der Rhodanese-ähnlichen Proteine	12
1.6	Ziele der Arbeit	16
2.	Ergebnisse	17
2.1	Identifizierung von Interaktionspartnern von MOCS3 mit dem Yeast-Two-Hybrid System.....	17
2.2	Klonierung und Expression von Gesamt-MOCS3	20
2.2.1	Zink-Bestimmung von MOCS3-GST	22
2.2.2	Klonierung und Expression der Rhodanese-ähnlichen-Domäne von MOCS3 (MOCS3-RLD).....	22
2.3	Sulfurtransferase Aktivität von MOCS3 und MOCS3-RLD	24
2.4	Gekoppelter Rhodanese-Sulfit-Oxidase Assay	26
2.5	<i>In vitro</i> Analysen zur Thiocarboxylierung von MOCS2A durch MOCS3 und MOCS3-RLD	28
2.6	Charakterisierung der vier Cystein-Reste in MOCS3-RLD	30
2.6.1	Thiosulfat:Sulfurtransferase Aktivität der vier Cystein zu Alanin Varianten von MOCS3-RLD	31
2.6.2	Aktivität der vier Cystein zu Alanin Varianten bei der <i>in vitro</i> -Bildung von MPT	32
2.6.3	Nitratreduktase-Overlay mit MOCS3 und MOCS3-C412A	33
2.6.4	Detektion freier Sulfhydryl-Gruppen mit DTNB.....	35
2.7	Massenspektroskopische Untersuchungen an MOCS3-RLD	36
2.7.1	Bestimmung der Masse von MOCS3-RLD durch ESI-MS.....	37
2.7.2	Tryptische Spaltung von MOCS3-RLD zur Entfernung des His ₆ -Tags.....	40
2.7.3	Detektion der Schwefelbindung von MOCS3-RLD mittels ESI-MS	42
2.7.4	ESI-MS/MS Analyse zum direkten Nachweis des Persulfids an C412.....	44
2.8	Nitratreduktase Assays mit MOCS3 und MOCS3-C239A	46
2.9	Fusionsprotein aus <i>E. coli</i> MoeB und MOCS3-RLD	49
2.9.1	Klonierung, Expression und Aufreinigung von MoeB-MOCS3-RLD	49

2.9.2	Funktionalität von MoeB-MOCS3-RLD.....	50
2.10	Humanes Nfs1	52
2.10.1	Klonierung und Aufreinigung von humanem Nfs1	52
2.10.2	Photometrische Charakterisierung von Nfs1	54
2.10.3	Komplementation einer Hefe-Nfs1 Mutante mit humanem Nfs1	56
2.11	Lokalisation von MOCS3, MOCS2A und MOCS2B.....	57
3.	Diskussion	61
3.1	Interaktionspartner von MOCS3	61
3.2	Lokalisation von MOCS3, MOCS2A und MOCS2B.....	63
3.3	Heterologe Expression und Aufreinigung von MOCS3.....	64
3.4.	Charakterisierung der Rodanese-ähnlichen Domäne von MOCS3	66
3.4.1	Thiosulfat:Sulfurtransferase Aktivität von MOCS3-RLD	66
3.4.2	Humanes Nfs1 als Schwefelquelle?	69
3.4.3	Der Schwefeltransfer Mechanismus von MOCS3-RLD	70
3.4.4	Direkter Nachweis des Persulfids durch ESI-MS	71
3.5	Thiocarboxylierung von MOCS2A durch MOCS3.....	74
4.	Material und Methoden	81
4.1	Material	81
4.1.1	Verwendete Medien, Puffer und Lösungen	81
4.1.2	Verwendete Chemikalien und Enzyme.....	81
4.1.3	Verwendete Plasmide.....	81
4.1.4	Bakterien- und Hefestämme	82
4.2	Molekularbiologische Arbeiten	83
4.2.1	Klonierungstechniken	83
4.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	83
4.2.3	PCR-Mutagenese	83
4.2.4	DNA-Sequenzierung.....	84
4.3	Proteinbiochemische Arbeiten	85
4.3.1	Rekombinante Expression und Aufreinigung von Proteinen	85
4.3.1.1	Expression und Aufreinigung von MOCS3-GST	85
4.3.1.2	Expression und Aufreinigung von MOCS3-RLD.....	86
4.3.1.3	Expression und Aufreinigung von MoeB-MOCS3-RLD	86
4.3.1.4	Expression und Aufreinigung von Nfs1 Δ 35	87
4.3.2	Konzentrierung von Proteinlösungen	88

4.3.3	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	88
4.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	88
4.3.5	Immunoblot-Analyse.....	89
4.3.6	Protein-Sequenzierung.....	90
4.4	Nachweis von Enzymaktivitäten	90
4.4.1	Rhodanese-Assay	90
4.4.2	<i>In vitro</i> Assay zur Bildung von MPT (Form A-Bestimmung)	90
4.4.3	Nitratreduktase-Overlay zur qualitativen Bestimmung der <i>E. coli</i> NR-Aktivität.....	92
4.4.4	Quantitativer Nitratreduktase Assay	92
4.4.5	Gekoppelter Rhodanese-Sulfit-Oxidase Assay	93
4.4.6	PAR-Assay zur Zinkbestimmung	94
4.4.7	Detektion freier Sulfhydryl-Gruppen mit DTNB.....	94
4.4.8	Photometrischer Nachweis der Reduktion von Nfs1 Δ 35	94
4.4.9	H ₂ S-Nachweis zur Bestimmung der L-Cystein-Desulfurase Aktivität	95
4.5	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS).....	95
4.6	Two-Hybrid Screen.....	96
4.6.1	Herstellung kompetenter <i>S. cerevisiae</i> Zellen	98
4.6.2	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	98
4.6.3	„Library Scale“ Transformation	98
4.6.4	Plasmidisolierung aus <i>S. cerevisiae</i>	99
4.6.5	β -Galaktosidase-Assay.....	99
4.6.6	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen für die Elektroporation.....	100
4.6.7	Elektroporation	100
4.7	Arbeiten mit humanen- und Maus-Zelllinien	101
4.7.1	Vorbereitung der Hela- und C2C12-Zellen zur Transfektion	101
4.7.2	Transiente Transfektion von Hela- und C2C12-Zellen	102
4.7.3	Vorbereitung der transfizierten Zellen für die Fluoreszenz-Mikroskopie	102
5.	LITERATURVERZEICHNIS	104
6.	ANHANG	113
6.1	Plasmide	113
6.1	Primer	114

1. Einleitung

1.1 Molybdän in biologischen Systemen

Molybdän (Mo) gehört als einziges Metall aus der 2. Reihe der Übergangsmetalle des Periodensystems zu den biologisch aktiven Spurenelementen und stellt in Form des Molybdäncofaktors (Moco) einen essentiellen Faktor im Stoffwechsel von Eukaryoten dar. Die Bedeutung des Molybdäns für Mikroorganismen wurde durch Bartels (1930) bereits sehr früh erkannt. Hinweise auf die biologische Bedeutung des Molybdäns für höhere Organismen wurden aufgrund der ausreichenden Supplementierung innerhalb der Nahrungskette erst viele Jahre später beschrieben. Vor ca. 60 Jahren gab es erstmals Hinweise auf eine Molybdän-Defizienz bei Feldpflanzen (zusammenfassend dargestellt von Gupta, 1997). Nur kurze Zeit später wurde der erste Anhaltspunkt zur direkten Assoziation von Molybdän in Enzymen beschrieben. Westerfeld & Reichert (1949) entdeckten einen Faktor, welcher als Molybdatsalz essentiell für die enzymatische Aktivität der Xanthin-Oxidase in Leber und Magen von Ratten ist. In den folgenden Jahren wurde die Molybdän-Enzym-Interaktion für die Nitrat-Reduktase aus *Neurospora crassa* (Nicholas & Nason, 1954), die tierische Aldehyd-Oxidase (Mahler *et al.*, 1954), und der tierischen Sulfat-Oxidase beschrieben. Durch die Arbeiten von Pateman *et al.* (1964) ergaben sich später erste Hinweise auf das Vorkommen eines einheitlichen Molybdän-assoziierten Enzym-Cofaktors.

Es konnten *Aspergillus nidulans* Mutanten isoliert werden, die einen gleichzeitigen Verlust von Nitrat-Reduktase- und Xanthin-Dehydrogenase-Aktivität zeigten (Pateman *et al.*, 1964). Da die einzige Gemeinsamkeit dieser Mutanten im Ausfall dieser beiden Molybdän-abhängigen Enzyme bestand, wurde daraus die Theorie abgeleitet, dass beide Enzyme einen gemeinsamen Molybdän-haltigen Cofaktor besitzen, der in den Mutanten nicht mehr gebildet werden konnte. Diesen bezeichneten sie als Molybdäncofaktor (Moco). Den funktionellen Beweis, dass der Molybdäncofaktor auch zwischen verschiedenen Organismen austauschbar ist, wurde erstmals von Nason *et al.* (1971) beschrieben und geht auf Versuche mit der pleiotropen *nit-1*-Mutante aus *N. crassa* zurück (Sorger & Giles, 1965). Die *nit-1*-Mutante ist nicht in der Lage, aktiven Molybdäncofaktor zu synthetisieren und enthält daher inaktives Nitrat-Reduktase-Apoprotein. Nason *et al.* (1971) zeigten, dass die

Aktivität des Nitrat-Reduktase-Apoproteins rekonstituierbar ist, wenn die niedermolekulare Fraktion denaturierter Molybdoenzyme pflanzlicher, tierischer oder bakterieller Herkunft zugesetzt wurde. Diese Rekonstitution der *nit-1*-Mutante findet seitdem als sogenannter *nit-1*-Test Anwendung in der Erforschung der Moco-Biosynthese. Der einzige bisher bekannte Fall für die Nicht-Rekonstitution im *nit-1*-Test durch ein Molybdoenzym ist die Nitrogenase, die einen Eisen-Molybdäncofaktor (Fe-Moco) enthält (Pienkos *et al.*, 1977; Ludden *et al.*, 1993).

Bis zum heutigen Tag konnten mehr als 40 Enzyme mit einem Molybdäncofaktor isoliert werden, die unterschiedliche Redox-Reaktionen katalysieren. Zu diesen zählen unter anderen Nitrat-Reduktasen, Xanthin-Oxidasen und Sulfat-Oxidasen (Hille, 1996). Eukaryotische Molybdoenzyme enthalten ausschließlich den Molybdopterincofaktor, in Bakterien kann dagegen über eine Pyrophosphatbindung ein zusätzliches Nukleotid addiert werden, wodurch ein Molybdopterin-Dinukleotid-Cofaktor entsteht.

Einen Vorschlag zur Struktur des Molybdäncofaktors wurde erstmals von Rajagopalan und Johnson (1982) veröffentlicht. Sie beschrieben eine Pterinverbindung mit einer 4C-Alkyl-Seitenkette, an welche das Molybdän über eine Dithiolengruppe komplexiert wird. Dieses erste Strukturmodell wurde durch die Kristall-Strukturanalyse der Aldehyd-Oxidase aus *Desulfovibrio gigas* grundsätzlich bestätigt (Romao *et al.*, 1995). Allerdings zeigte die Struktur, dass der Molybdäncofaktor eine tricyclische Form besitzt, da sie noch einen zusätzlichen Pyranoring über die Bindung einer OH-Gruppe der Seitenkette an den bicyclischen Pterinring ausbildet (Abb. 1.1.). Die Kristallisation weiterer Molybdoenzyme (DMSO-Reduktase, Formiat-Dehydrogenase, ua.) in der Folgezeit bestätigte diese postulierte Struktur des Molybdäncofaktors (Schindelin *et al.*, 1996, 1997; Boyington *et al.*, 1997; Kisker *et al.*, 1997). Bei Eubakterien kommt es im Gegensatz zu den höheren Organismen zu einer zusätzlichen Modifikation des Molybdäncofaktors. Biochemische Analysen ergaben, dass über eine Pyrophosphat-Bindung dem ursprünglichen Molybdäncofaktor noch ein GMP an das C4-Atom der Seitenkette angehängt wird (Johnson *et al.*, 1990). Es ist auch die Modifikation durch weitere Nukleotide wie AMP oder CMP beschrieben (Börner *et al.*, 1991).

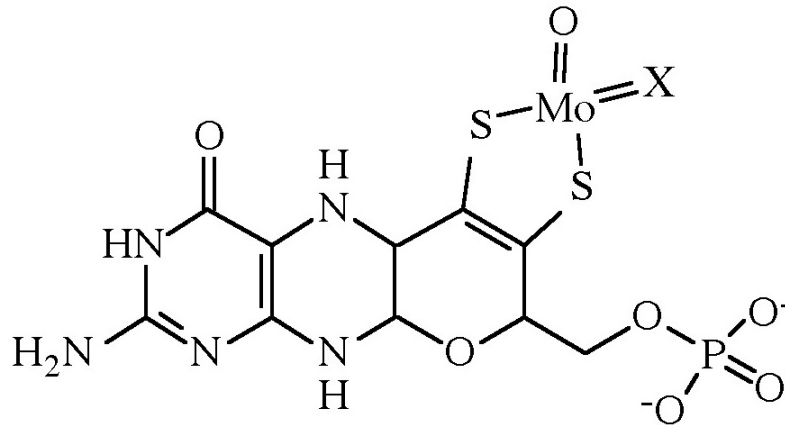


Abb. 1.1: Strukturformel des Molybdäncofaktors

Die dargestellte Form entspricht der Grundstruktur des Moco. In eubakteriellen Organismen treten einige Varianten auf, bei denen die Alkyl-Seitenkette über eine Pyrophosphat-Bindung mit einem Nukleotid verbunden ist. Das X am Molybdän steht entweder für ein O (Dioxo-Form) oder ein S (Monooxo-Form).

1.2 Die Biosynthese des Molybdäncofaktors

Am besten untersucht ist die Biosynthese des Molybdäncofaktors in *E. coli*, an der insgesamt 15 Gene, organisiert in 5 Operons (*moa*, *mob*, *mod*, *moe* und *mog*), beteiligt sind. In dem von Rajagopalan (1996) vorgeschlagenen Modell zur Moco-Biosynthese in *E. coli* wurde diese in vier Schritte unterteilt.

Im ersten Schritt bilden die Genprodukte von *moaA* und *moaC* aus GTP den sogenannten Precursor Z. Der zweite Schritt beinhaltet die Umwandlung von Precursor Z zu Molybdopterin (MPT). An dieser Reaktion sind die Proteine Moad, MoeB und MoeC beteiligt. Moad und MoeC bilden einen heterotetrameren Komplex, der als MPT-Synthase bezeichnet wird. Die MPT-Synthase hängt dem Precursor Z die Dithiolen-Gruppe an, die das Molybdän-Atom koordiniert (Pitterle und Rajagopalan, 1993). Für die Funktion der MPT-Synthase ist eine Aktivierung durch MoeB notwendig (Johnson & Rajagopalan, 1987a+b; Pitterle *et al.*, 1989). MoeB katalysiert die Ausbildung einer Acyl-Adenylat-Bindung an der C-terminalen Carboxylat-Gruppe von Moad (Leimkühler *et al.*, 2001, Lake *et al.*, 2001). Nach der Aktivierung der MPT-Synthase durch MoeB wird diese über die Funktion einer noch nicht eindeutig identifizierten Sulfurtransferase sulfuryliert (Leimkühler und Rajagopalan, 2001). Als Schwefelquelle fungiert hierbei vermutlich Cystein.

Im dritten Schritt wird das Molybdän in das MPT-Molekül eingebaut, dies wird vermutlich durch das MogA-Protein katalysiert. Hinweise auf diese postulierte

Funktion von MogA ergaben Arbeiten mit *E. coli-mogA*-Mutanten, welche in der Lage sind MPT, zu synthetisieren, aber nur durch Zugabe hoher Molybdatkonzentrationen aktive Molybdoenzyme aufwiesen (Hinton & Dean, 1990; Joshi *et al.*, 1996). Kürzlich konnten anhand von Untersuchungen an dem MogA-homologen Protein Cnx1 aus *Arabidopsis thaliana* weitere Informationen zur Funktion dieser Proteine erhalten werden. Cnx1 besteht aus einer MoeA-homologen und einer MogA-homologen Domäne und von letzterer konnte die Kristallstruktur gelöst werden (Kuper *et al.*, 2004). Anhand dieser Kristallstruktur war zu erkennen, dass in diesem Stadium der Moco-Biosynthese Kupfer über die Dithiolen-Gruppe koordiniert wird und das MPT in einer adenylierten Form (MPT-AMP) vorliegt. Die Adenylierung von MPT konnte dann in biochemischen Analysen direkt der Cnx1-G-Domäne zugeordnet werden und für die Funktion der MoeA-homologen Cnx1-E-Domäne wird die Spaltung des MPT-Adenylats und die Insertion des Molybdäns postuliert (Llamas *et al.*, 2004).

An der Bereitstellung des Molybdäns innerhalb der Zelle sind die Gene des *mod*-Operons beteiligt (*modA*, *modB* und *modC*), welche für einen hochaffinen Molybdat-Transporter kodieren (Rech *et al.*, 1995). Über den weiteren Weg des Molybdäns in der Zelle und mögliche Modifizierungen, wie zum Beispiel einer Aktivierung vor der Inkorporation in das MPT, ist bisher nichts bekannt.

Der vierte Schritt, das Anhängen eines Guanin-Nukleotids an das MPT, ist bisher nur für Eubakterien gezeigt. Dieser Schritt wird von den *mobAB* Genen kodiert und mündet in der aktiven Form des Molybdäncofaktors für Eubakterien, dem Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid (MGD) (Palmer *et al.*, 1994, 1996).

Die Proteine für die Biosynthese des Molybdäncofaktors im Menschen zeigen hohe Homologien zu den entsprechenden *E. coli* Proteinen. Abb. 1.2 verdeutlicht, dass es für jeden der ersten drei Schritte der Moco-Biosynthese ein homologes Protein im Menschen gibt. Jedoch konnten signifikante Unterschiede in der Organisation der entsprechenden Gene identifiziert werden.

Für den ersten Schritt der humanen Moco-Biosynthese, der Umwandlung von GTP zu Precursor Z kodiert der MOCS1 Lokus für die beiden Proteine MOCS1A und MOCS2B, welche homolog zu den *E. coli* Proteinen MoaA und MoaC sind. Diese beiden Proteine werden ungewöhnlicher Weise durch eine bicistronische Genstruktur kodiert, wobei beide Gene getrennt durch ein Stop Codon, auf einem einzelnen Transkript vorliegen (Gross-Hard & Reiss, 2002). Interessanterweise konnten bisher

keine Hinweise auf eine separate Expression von MOCS1B gefunden werden. Es wurden nur exprimierte Splice Varianten identifiziert, welche zu der Expression eines Zwei-Domänen Proteins aus MOCS1A und MOCS1B führen (Gray and Nicholls, 2000), wobei MOCS1A in einer inaktiven Form vorliegt. MOCS1A hingegen wird als separates Protein expremiert (Hänzelmann, 2002).

Die MPT-Synthase, welche im zweiten Schritt der Mocobiosynthese die Umwandlung von Precursor Z zu MPT katalysiert wird ebenfalls von einem bicistronischen Lokus kodiert (Stallmeyer *et al.*, 1999a), wobei allerdings gezeigt werden konnte, dass diesmal sowohl MOCS2A (homolog zu *E. coli* MoaD) als auch MOCSB2 (homolog zu *E. coli* MoaE) als separates Protein expremiert werden (Stallmeyer *et al.*, 1999a). Das für die Adenylierung von MOCS2A zuständige Protein MOCS3 verfügt neben einer N-terminalen zu *E. coli* MoeB homologen Domäne noch zusätzlich über ein C-terminale Domäne mit Homologien zu Rhodanese-ähnlichen Proteinen.

Im dritten und somit letzten Schritt der humanen Moco-Biosynthese kommt es zum Einbau von Molybdän in MPT durch das Zwei-Domänen Protein Gephyrin. Gephyrin besteht aus einer N-terminalen Domäne mit Homologien zu *E. coli* MogA und aus einer C-terminalen Domäne mit Homologien zu *E. coli* MoeA. Beide Domänen sind dabei noch durch eine Linker Region voneinander getrennt (Stallmeyer *et al.*, 1999b). Zuerst wurde Gephyrin nicht im Zusammenhang zur Moco-Biosynthese beschrieben, sondern als Neurorezeptor Anker Protein, welches Glycin Rezeptoren in der postsynaptischen Membran mit dem Cytoskelett verbindet (Kirsch *et al.*, 1993) (Kirsch und Betz, 1998). Folglich wurde klar, dass Gephyrin zwei verschiedene Funktionen in der Zelle ausübt, zum einen eine strukturelle in der Verankerung von Glycin Rezeptoren, zum anderen eine katalytische in der Biosynthese des Molybdäncofaktors. Die Kristall-Struktur der MogA-homologen Domäne von Gephyrin zeigte weiterhin eine sehr hohe Struktur-Homologie zu MogA, was die Annahme einer identischen Funktion der beiden Proteine unterstützt (Schwarz *et al.*, 2001).

Im Gegensatz zur Moco-Biosynthese in *E. coli* kommt es jetzt allerdings nicht zu der Anfügung eines Nukleotids an den Molybdäncofaktor, sondern der Molybdäncofaktor wird ohne weitere Modifizierung in die jeweiligen Apo-Proteine eingebaut. Für die Aktivität der Molybdoenzyme Xanthin-Dehydrogenase und Aldehyd-Oxidase ist allerdings noch der Austausch eines Sauerstoff-Liganden gegen einen Schwefel-Liganden am Molybdän Atom durch eine Moco Sulfurase (MCSU) nötig. Moco Sulfurase Aktivitäten wurden unter anderem bereits für Aba3 in Pflanzen (Bittner *et*

al., 2001) und HMCS im Menschen (Ichida *et al.*, 2001) beschrieben. Bei diesen Proteinen handelt es sich um NifS-ähnliche Proteine, welche Cystein Desulfurase Aktivität besitzen und somit den Schwefel von Cystein auf den Molybdäncofaktor übertragen.

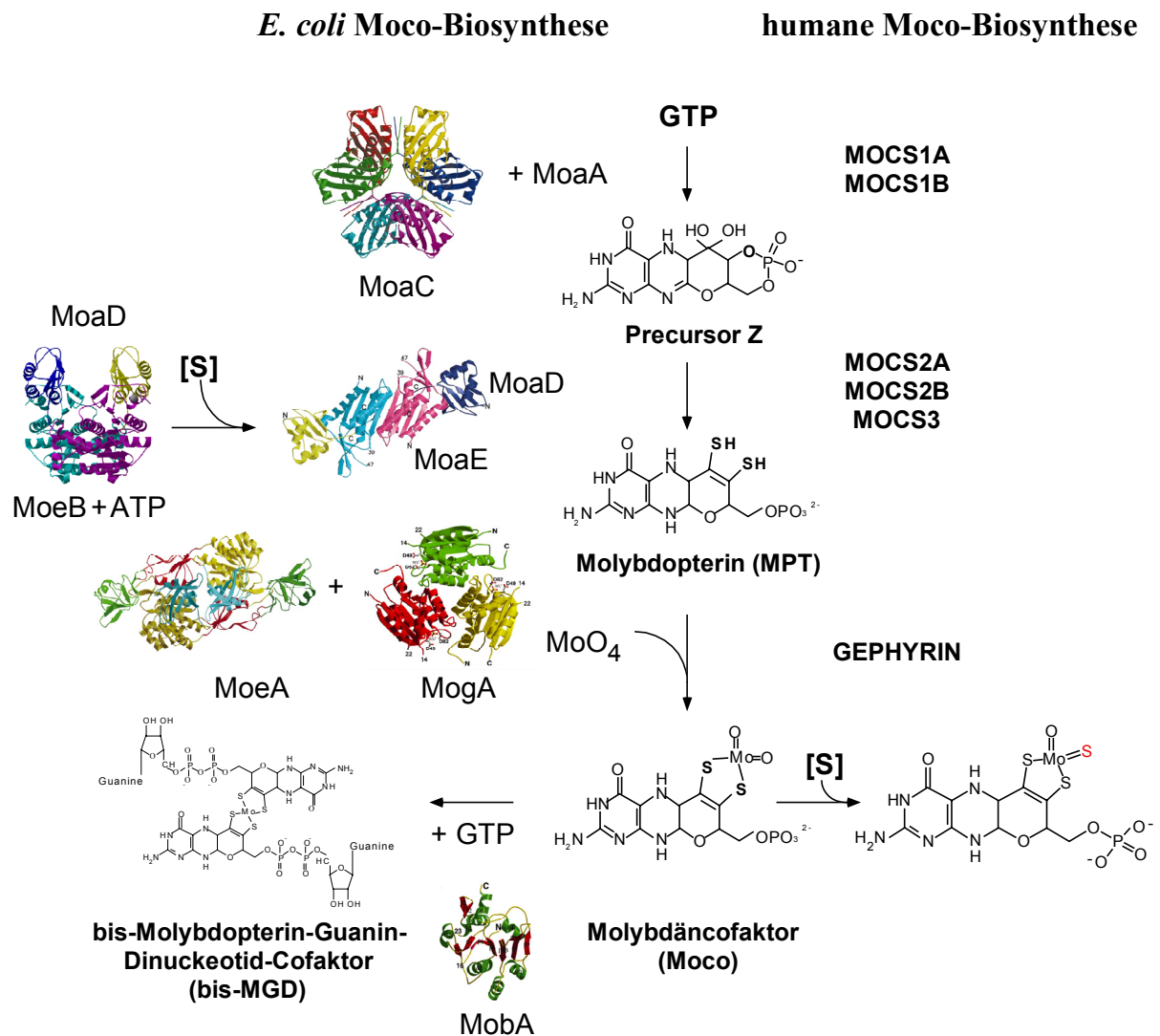


Abb. 1.2: Die Molybdäncofaktor Biosynthese

Vergleichende Darstellung der Molybdäncofaktor-Biosynthese in *E. coli* und im Menschen. Die Kristallstrukturen von MoaC, MoaD/MoaE, MoeA, MogA und MoaB wurden gelöst. In *E. coli* wird der Moco noch durch das Anhängen eines GMP's modifiziert und liegt im Protein dann als bis-MGD Cofaktor vor. Im Gegensatz dazu wird im humanen System kein Nukleotid angefügt. Für die Enzyme Xanthin Dehydrogenase und Aldehyd Oxidase wird aber noch ein terminaler Schwefelligand durch eine Sulfurtransferase (HCMS) an das Molybdän ligiert.

1.3. Humane Molybdäncofaktor-Defizienz

Der Molybdäncofaktor ist essentiell für die drei bisher bekannten humanen Molybdoenzyme Sulfat-Oxidase, Xanthin-Dehydrogenase und Aldehyd-Oxidase (Reiss, 2000). Moco Defizienz führt zum kompletten Verlust der Aktivität aller drei Molybdoenzyme und in den meisten Fällen zum Tod im frühen Kindesalter (Johnson und Wadman, 1995). Der Phänotyp der Moco Defizienz ist mit dem der isolierten Sulfat-Oxidase Defizienz identisch und beruht auf dem Ausfall der Sulfat-Oxidase (Abb.1.3). Bis heute sind weltweit etwa einhundert Fälle von Moco Defizienz oder isolierter Sulfat-Oxidase Defizienz bekannt. Der Ausfall der Sulfat-Oxidase führt im Menschen zu einer Vergiftung mit Sulfat und dadurch zu irreversiblen neurologischen Schäden im Gehirn, dislozierten Augenlinsen u.a., was in den meisten Fällen zum sehr frühen Tod führt.

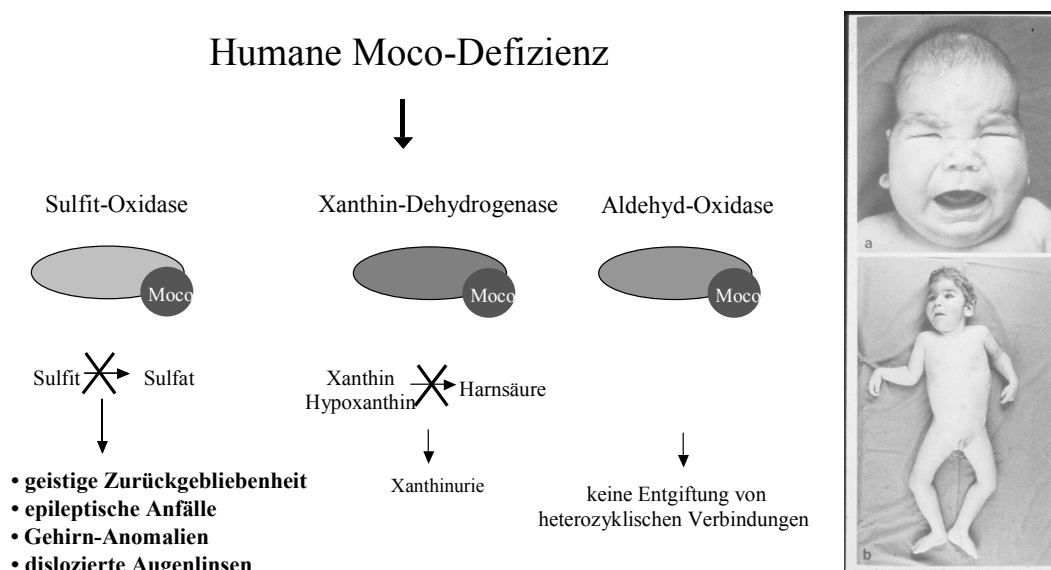


Abb. 1.3: Auswirkung der Molybdäncofaktor-Defizienz beim Menschen

Dargestellt ist die jeweilige Konsequenz eines fehlenden Molybdäncofaktors für das jeweilige Molybdoenzym. Rechts zwei Fotografien von Patienten mit Moco-Defizienz.

Die Moco Defizienz wird in drei Patientengruppen eingeteilt, wobei die erste Gruppe (A) nicht mehr in der Lage war Precursor Z zu bilden, die zweite (B) hingegen Precursor Z akkumulierte. Gruppe A Patienten haben demnach einen genetischen

Defekt im MOCS1 Locus und somit im ersten Schritt der Moco-Biosynthese, Gruppe B Patienten einen Defekt im MOCS2 Locus und daher im zweiten Schritt der Moco-Biosynthese. Die dritte Gruppe zeigt einen genetischen Defekt in Gephyrin (Reiss *et al.*, 2001).

Bisher konnten noch keine Patienten mit einem genetischen Defekt in *MOCS3* beschrieben werden. Dies kann daran liegen, dass entweder die Funktion von *MOCS3* von einem anderen Protein übernommen werden kann, oder aber der Ausfall von *MOCS3* letal ist. Dies würde auf eine eventuelle weitere Funktion von *MOCS3* in einem anderen Stoffwechselweg im Menschen hinweisen.

1.4. Der zweite Schritt der Moco-Biosynthese

Im zweiten Schritt der Moco-Biosynthese wird die organische Komponente des Cofaktors, das Molybdopterin synthetisiert. Dazu wird der Schwefel über eine Dithiolengruppe an den Positionen C1' und C2' in den Precursor Z eingebaut. Diese Reaktion wird in *E. coli* von der MPT-Synthase katalysiert, einem Heterotetramer bestehend aus zwei Molekülen MoeA (je ~ 8750 Da) und zwei Molekülen MoeB (je ~ 16850 Da). Pitterle *et al* (1993) waren in der Lage, ein *in vitro* System zur Bildung von MPT zu etablieren, welches lediglich aus MPT-Synthase und Precursor Z besteht. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die kleine Untereinheit MoeA den Schwefel trägt, da MoeA im Gegensatz zu MoeB eine Sensitivität gegenüber Sulfhydrylreagenzien wie N-Ethylmaleimid, N-Bromosuccinimid und Iodoacetamid zeigt (Pitterle und Rajagopalan, 1993). Die Reinigung einer inaktiven MPT-Synthase aus einer *moeB*-Mutante und ihr Vergleich zur aktiven MPT-Synthase durch Massenspektrometrie zeigte eine Differenz von 16 Da für MoeA. Diese Massendifferenz korrespondiert mit dem Austausch eines Sauerstoffs gegen einen Schwefel und so wurde die Bildung eines Thiocarboxylates am C-terminalen Glycin von MoeA postuliert (Pitterle und Rajagopalan, 1993).

Die MPT-Synthase muss folglich zu ihrer Aktivierung thiocarboxyliert werden. Die Beobachtung, dass eine *E.coli moeB*-Mutante keine aktive MPT-Synthase besitzt und Precursor Z akkumuliert führte dazu, MoeB als MPT-Synthase-Sulfurase zu bezeichnen, welche die Thiocarboxylatgruppe am C-Terminus von MoeA regeneriert. MoeB zeigt starke Homologien zum eukaryotischen Ubiquitin-aktivierenden Enzym (E1) Uba1 und MoeA verfügt über das identische Doppel-Glycin Motiv an seinem C-

Terminus wie Ubiquitin. Ubiquitin wird im Prozess des Proteinabbaus in der Zelle zur Markierung an abzubauen Proteine fusioniert. Uba1 aktiviert während dieses Prozesses unter ATP-Verbrauch das C-terminale Glycin von Ubiquitin unter Bildung eines Uba1-Ubiquitin-Adenylat Komplexes. Im Anschluss daran bildet sich ein Thioester zwischen dem C-Terminus von Ubiquitin und einem Cystein-Rest von Uba1 aus. Ubiquitin wird daraufhin auf ein Ubiquitin-Carrier-Protein (E2) übertragen bevor es durch ein Ubiquitin-Isopeptid-Ligase-Protein (E3) auf ein Zielprotein übertragen wird. In der Folgezeit konnte dann auch für MoeB gezeigt werden, dass es analog zu den E1-Enzymen die kleine Untereinheit der MPT-Synthase für die eigentliche Sulfurierung aktiviert, indem es unter ATP-Verbrauch ein Acyladenylat am C-Terminus von MoaD ausbildet (Leimkühler *et al.*, 2001). Lake *et al* (2001) gelang es dann, den Komplex aus MoeB und MoaD zu kristallisieren und Details der Reaktion konnten verdeutlicht werden. Allerdings konnte für MoeB durch Mutationsanalysen belegt werden, dass es nicht zu der Ausbildung eines Thioesters zwischen einem Cystein-Rest und aktiviertem MoaD kommt und hier somit ein deutlicher Unterschied zur Aktivierung von Ubiquitin vorliegt (Leimkühler *et al.*, 2001). Auf das acyladenylierte MoaD wird dann durch eine Sulfurtransferase der Schwefel übertragen und die Thiocarboxylatgruppe ausgebildet und auch hier konnte durch Mutationsanalysen aller konservierten Cystein-Reste von MoeB gezeigt werden, dass an dieser Reaktion wohl keiner dieser Reste beteiligt ist. Es konnte festgestellt werden, dass hierzu *in vitro* verschiedene Cystein-Desulfurasen wie IscS in der Lage sind (Leimkühler *et al.*, 2001). Allerdings konnte diese Funktion *in vivo* bisher noch keinem spezifischen Protein zugeordnet werden, da eine *E. coli* IscS-Mutante immer noch in der Lage ist, aktiven Molybdäncofaktor zu produzieren.

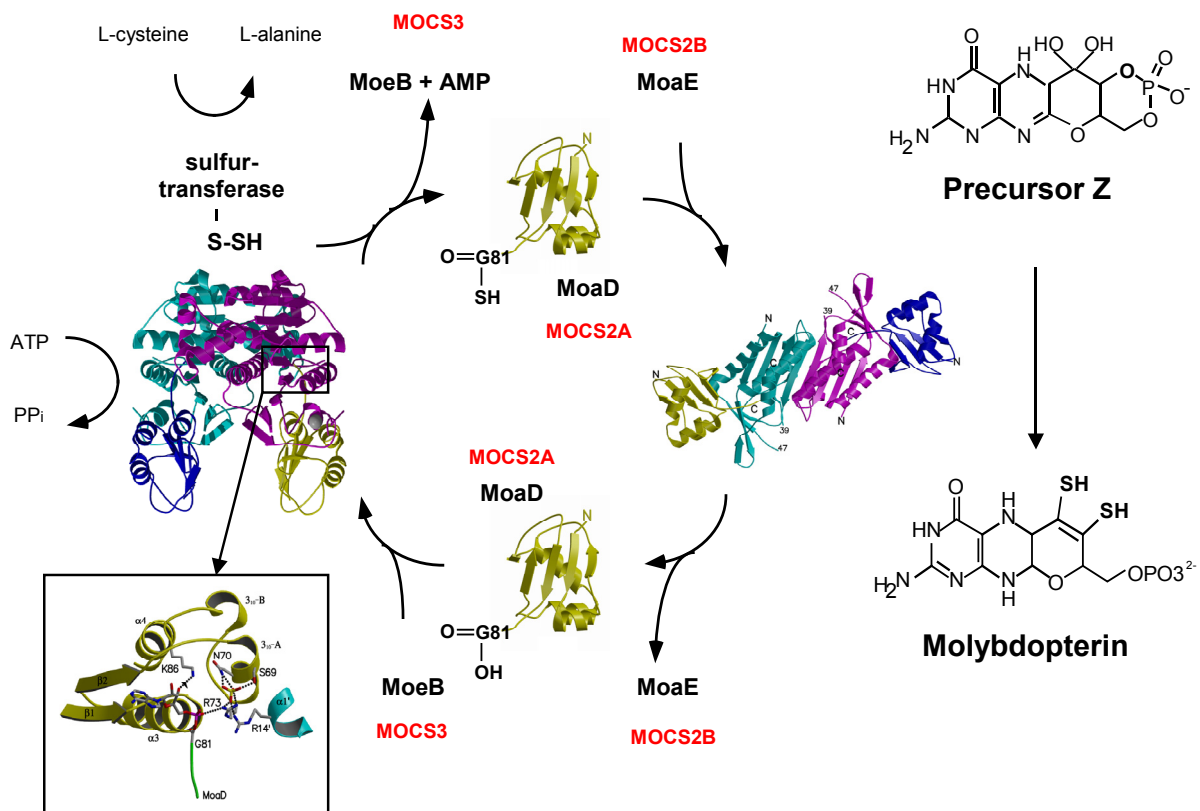


Abb. 1.4: Der zweite Schritt der Moco-Biosynthese

Dargestellt sind die einzelnen Stationen und Interaktionen von MoaD während der Umwandlung von Precursor Z zu MPT und dessen Regeneration. Die jeweiligen homologen humanen Proteine sind in rot verzeichnet. MoaD bildet in seiner thiocarboxylierten Form mit MoaE die aktive MPT-Synthase, welche Precursor Z zu MPT umwandelt. Danach dissoziiert das carboxylierte MoaD von MoaE und bindet an das MoeB Dimer. Hier wird unter ATP-Verbrauch MoaD Acyl-Adenylat gebildet. Dieses MoaD-AMP ist aktiviert für die Sulfurierung durch eine Sulfurtransferase, wobei wahrscheinlich Cystein als Schwefelquelle fungiert. Das nun frisch thiocarboxylierte MoaD dissoziiert wieder vom MoeB und bildet erneut mit MoaE die aktive MPT-Synthase.

Auch die Aktivität der MPT-Synthase im Menschen wurde vor kurzem analysiert und beschrieben. Leimkühler *et al* (2003) konnten zeigen, dass auch die humane MPT-Synthase in einer heterotetrameren Form aus zwei kleinen Untereinheiten MOCS2A und zwei großen Untereinheiten MOCS2B vorliegt. Es konnte gezeigt werden, dass *in vitro* sowohl MoaD gegen MOCS2A, als auch MoaE gegen MOCS2B austauschbar sind. Dies zeigt die hohe Konservierung der Proteine der Moco-Biosynthese unter verschiedenen Organismen.

Im Gegensatz zur Reaktivierung der MPT-Synthase in *E. coli* durch MoeB und einer Cystein-Desulfurase ist über diese Reaktion im humanen System noch sehr wenig bekannt. Das hierfür in Frage kommende Protein ist MOCS3. Aufgrund der Homologien von MoeB mit dem humanen Protein MOCS3 kann auch hier die Acyladenylierung von MOCS2A durch MOCS3 vermutet werden. MOCS3 verfügt jedoch zusätzlich zum N-terminalen MoeB-homologen Bereich noch über einen weiteren C-terminalen Bereich mit Homologien zu Rhodanesen (Abb.1.5). Rhodanesen gehören zu den Sulfurtransferasen und katalysieren *in vitro* den Schwefel-Transfer von Thiosulfat auf Cyanid. Diese zusätzliche Rhodanese-ähnliche Domäne findet man bei homologen Proteinen in Eukaryoten und es gibt auch einige wenige prokaryotische Organismen, welche über diese verfügen. Diese Beobachtung legt nahe, dass die Sulfurierung der acyladenylierten kleinen Untereinheit der MPT-Synthase im humanen System anders verläuft, als in *E. coli*. Hier könnte der Schwefel von der Rhodanese-ähnlichen Domäne von MOCS3 auf MOCS2A-AMP übertragen werden. Als Schwefelquelle könnte hier direkt eine anorganische Komponente wie Thiosulfat dienen, oder aber in Anlehnung an die Erkenntnisse aus der 4-Thiouridin-Biosynthese eine Cystein-Desulfurase (Kambampati & Lauhon, 1999). Das Protein Thil katalysiert hier durch seine Rhodanese-ähnliche Domäne den Schwefeltransfer auf eine durch Adenylierung aktivierte t-RNA (Palenchar *et al*, 2000) analog zur möglichen Funktion von MOCS3. Der Schwefel wird für diesen Zweck von der Cystein-Desulfurase IscS auf das katalytisch aktive Cystein 456 von Thil transferiert (Kambampati & Lauhon, 1999, 2000). Des weiteren postulierten Müller *et al* (2001) für diese Reaktion ein Disulfid-Intermediat zwischen dem katalytischen Cys-456 und einem weiteren Cystein-Rest von Thil (Cys-344). Alle eukaryotischen MoeB-homologen Proteine verfügen im Gegensatz zu den prokaryotischen über zusätzliche N-terminale Extensionen, welche in ihrer Länge stark variieren und untereinander, sowie zu anderen Proteinen keine signifikanten Sequenzhomologien aufweisen. Da diese Extensionen besonders bei den eukaryotischen Vertretern zu finden sind, wäre eine Funktion bei der Lokalisierung der Proteine in bestimmte Zellkompartimente denkbar.

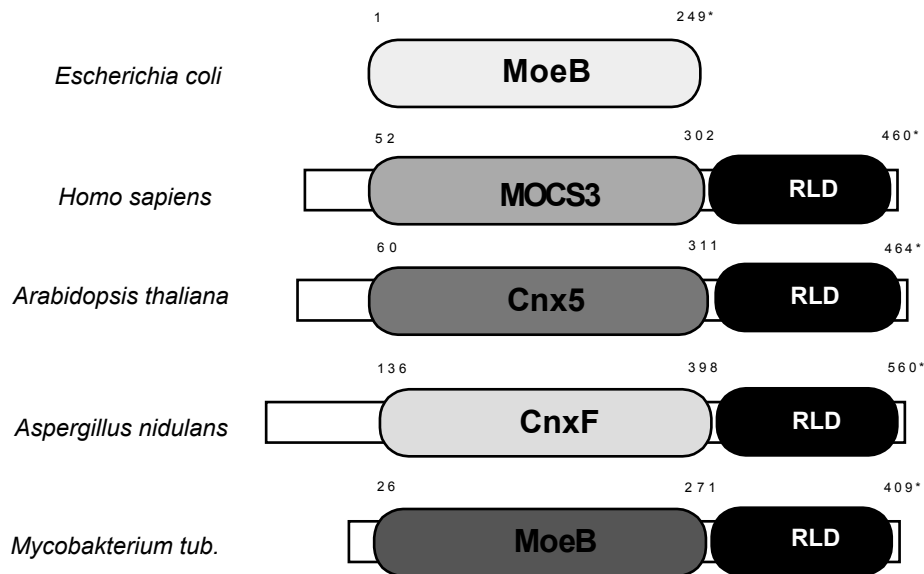


Abb. 1.5: Domänenstruktur MoeB-homologer Proteine aus verschiedenen Organismen

Die Zahlen an den einzelnen Domänen kennzeichnen die Aminosäureposition. (RLD:Rhodanese like domain).

1.5. Die Familie der Rhodanese-ähnlichen Proteine

Rhodanesen (Thiosulfat:Cyanid Sulfurtransferasen oder TSTs) sind weit verbreitete Enzyme welche *in vitro* den Transfer von einem Sulfan-Schwefel Atom von Thiosulfat auf Cyanid katalysieren. 3-Mercaptopyruvat:Cyanid Sulfurtransferasen (MSTs) katalysieren die gleiche Reaktion mit 3-Mercaptopyruvat als Schwefeldonor. MSTs zeigen hohe Sequenzhomologien zu Rhodanesen, wobei sie bis zu 66 Prozent Identität auf Aminosäure-Ebene aufweisen können (Nagahara *et al.*, 1995). Die am besten charakterisierte Sulfurtransferase ist die Rhodanese aus *Bos taurus* (Westley *et al.*, 1983; Luo und Horowitz, 1994; Nandi *et al.*, 2000).

Der katalytische Mechanismus erfolgt über die transiente Bildung eines Persulfid-enthaltendes Zwischenproduktes (E-S), wobei der zu transferierende Schwefel an den katalytischen Cystein-Rest der Rhodanese gebunden ist (Abb. 1.5).

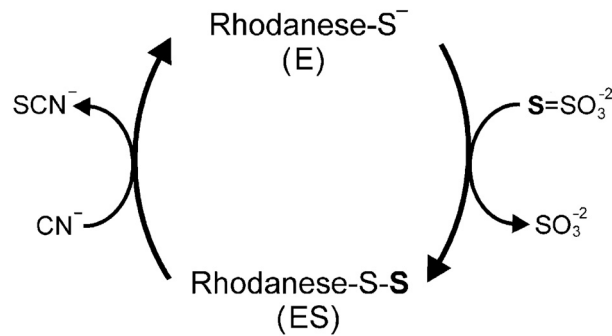


Abb. 1.6: Schema der Rhodanese-katalysierten Reaktion

Die Kristallstrukturen der Rhodanesen aus *Bos taurus* und aus *Azotobacter vinelandii* (RhdA) sind gelöst worden (Ploegman *et al.*, 1978; Bordo *et al.*, 2000). Beide Proteine weisen auf Proteinsequenz Ebene 22 Prozent Identität auf und zeigen ähnliche dreidimensionale Konformationen. Beide bestehen aus zwei identisch gefalteten Domänen, mit einer Länge von jeweils 120 Aminosäuren. Interessanterweise sind trotz der identischen Faltung der beiden Domänen nur schwache Aminosäure-Sequenzhomologien zu finden (13 % *B. taurus*-Rhodanese; 21 % *A. vinelandii*-RhdA). Nur die C-terminale Domäne dieser Rhodanesen mit Tandem-Domänen Architektur verfügt über das katalytische Cystein. Dieses Cystein ist der erste Aminosäure-Rest eines sechs Aminosäure langen „active site loop“ welcher die katalytische Tasche im Enzym bildet. Die biochemische und strukturelle Charakterisierung von GlpE, einer Thiosulfat:Cyanid Sulfurtransferase aus *E.coli*, bestehend aus nur einer einzigen Rhodanese-Domäne (Ray *et al.*, 2000; Spallarossa *et al.*, 2001), zeigt, dass die katalytisch inaktive N-terminale Domäne der TSTs und MSTs für die Katalyse nicht essentiell ist.

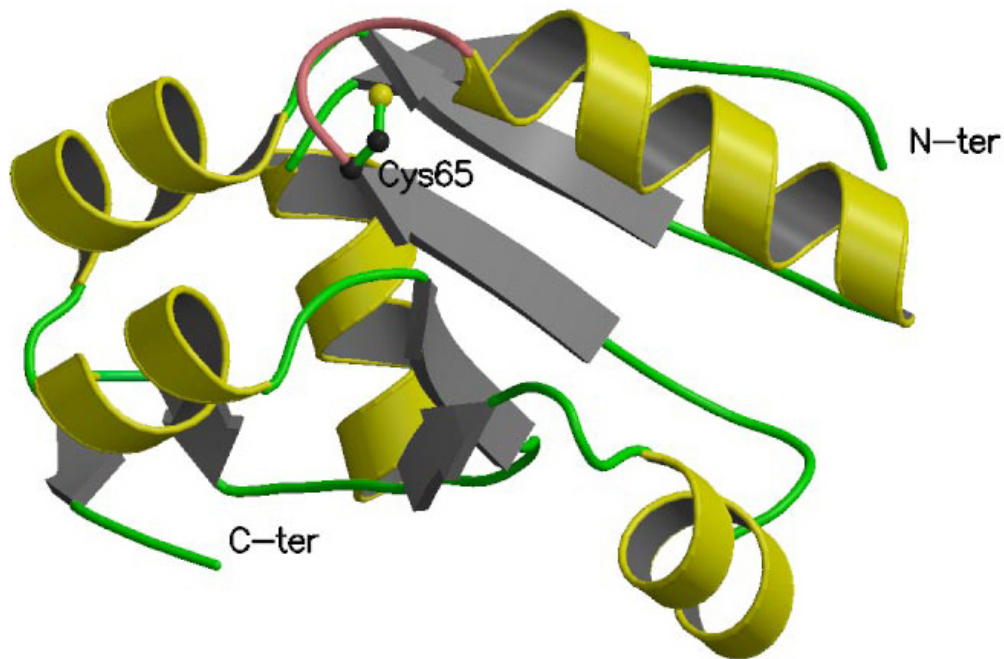


Abb. 1.7: Dreidimensionale Struktur von *E. coli* GlpE

α - Helices sind in grün dargestellt, β -Faltblätter in grau. Der charakteristische sechs Aminosäuren lange Loop ist in rosa dargestellt und das katalytische Cystein ist hervorgehoben. Das Protein zeigt die typische Faltung einer Rhodanese-Domäne mit 5 zentralen β -Faltblätter umrahmt von 5 α - Helices.

Auch die katalytische Domäne zweier humaner Cdc25 Phosphatasen, Cdc25A und Cdc25B, beides Schlüsselenzyme der Kontrolle des Zell-Zyklus, teilen die gleiche Faltungsstruktur mit den Rhodanesen und verfügen ebenfalls über das katalytisch aktive Cystein (Fauman *et al.*, 1998; Reynolds *et al.*, 1999). Der entscheidende Unterschied liegt hierbei in der Länge des katalytischen Loops. Wird dieser bei den Rhodanesen von sechs Aminosäuren gebildet, so sind es bei den Phosphatasen sieben. Dieses führt zu einer etwas weiteren katalytischen Tasche bei den Phosphatasen und ist somit besser geeignet für die Bindung eines Phosphats (van der Waals Radius 1,9 Å gegenüber 1,85 Å beim Schwefel).

Die biologische Rolle der Sulfurtransferasen wird bis heute vielfältig diskutiert, da die Identifizierung ihrer *in vivo* Substrate bisher ohne Erfolg geblieben ist und es erscheint unwahrscheinlich, dass es sich bei diesen Substraten um die *in vitro* getesteten Verbindungen handelt (Nandi *et al.*, 2000; Ray *et al.*, 2000). Vorgeschlagene Funktionen für Rhodanese-Domänen sind unter anderem Detoxifikation von Cyanid (Sorbo, 1957), Bildung von prosthetischen Gruppen in

Eisen-Schwefel-Proteinen (Pagani *et al.*, 1984), Verwaltung des Schwefel-Pools (Westley, 1989) oder Selen-Stoffwechsel (Ogasawara *et al.*, 2001). Die Beteiligung von Rhodanese-Domänen an bestimmten biologischen Prozessen wird wohl durch die Variabilität in der Aminosäuresequenz des katalytischen Loops bestimmt. Die Seitenketten dieser Aminosäuren bestimmen die Struktur der katalytischen Tasche und spielen somit eine entscheidende Rolle für die Substrat-Erkennung und die katalytische Aktivität. Bordo & Bork (2002) teilten die Rhodanese-Domänen anhand der Konsensus-Sequenzen ihrer katalytischen Loops in verschiedene Gruppen ein. Außerdem unterschieden sie die Rhodanese-Domänen anhand der modularen Zusammensetzung. So kommen Rhodanese-Domänen entweder als Tandem-Struktur, wie in TSTs vor, oder aber als einzelne Domäne, wie dies für GlpE der Fall ist. Es gibt Rhodanese-Domänen aber auch fusioniert mit anderen Proteindomänen, wie es zum einen bei den Cdc25 Phosphatasen der Fall ist, aber auch in Enzymen anderer Funktion wie zum Beispiel ThiI (Palenchar *et al.*, 2000) (Abb. 1.8).

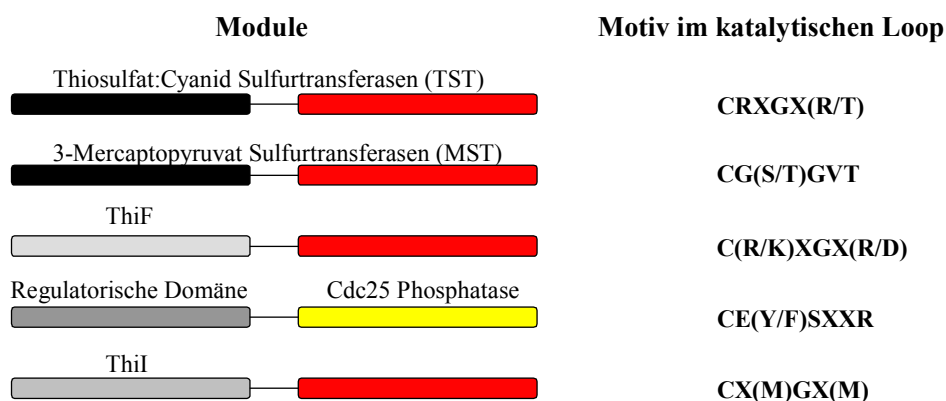


Abb.1.8: Rhodanese-Module in Verbindung mit weiteren Protein-Domänen

Die einzelnen Domänen sind als farbliche Boxen dargestellt. Katalytisch aktive Rhodanese-Domänen sind in rot dargestellt, inaktive in schwarz. Rhodanese-Domänen mit einem sieben Aminosäure langen Loop sind gelb markiert, alle weiteren Protein-Domänen in Grautönen. Positionen in den katalytischen Loop-Motiven mit mindestens 80 % Konservierung innerhalb der jeweiligen Proteinfamilie sind auch als konservierte Aminosäuren berücksichtigt.

Durch sensitive Homologie-Suchprogramme wurden inzwischen ca. 500 Gene mit einer Rhodanese-ähnlichen Domäne in den Genomen von Organismen der Eukaryoten, Prokaryoten und Archea gefunden. Unter anderem wurden im humanen Genom 47 solcher Domänen gefunden, in *E. coli* sind es acht.

1.6 Ziele der Arbeit

Gegenstand dieser Arbeit ist die biochemische und funktionelle Charakterisierung des humanen Proteins MOCS3. Dabei sollte in erster Linie die Rolle von MOCS3 bei der Ausbildung der Thiocarboxylat-Gruppe an MOCS2A im zweiten Schritt der Molybdäncofactor-Biosynthese analysiert werden. Insbesondere die Funktion, der im Gegensatz zum homologen *E. coli* Protein MoeB zusätzlichen C-terminalen Rhodanese-ähnlichen Domäne von MOCS3 sollte hierbei genauer untersucht werden. Zum einen deutet diese zusätzliche Domäne auf einen Unterschied zwischen humanen und *E. coli* System hin, zum anderen stellte dies eine Möglichkeit dar, einer Rhodanese-ähnlichen Domäne eine biologische Funktion zuzuordnen, da bisher noch sehr wenig über die Rollen dieser weitverbreiteten Domänen-Familie für die Zelle bekannt ist.

Da bisher noch keine Patienten mit einem genetischen Defekt in *MOCS3* beschrieben wurden besteht die Möglichkeit, dass der Ausfall von MOCS3 aufgrund einer weiteren Funktion innerhalb der Zelle letal ist. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit unter anderem versucht, mögliche Interaktionspartner von MOCS3 zu identifizieren.

2. Ergebnisse

2.1 Identifizierung von Interaktionspartnern von MOCS3 mit dem Yeast-Two-Hybrid System

Das „Yeast-Two-Hybrid“-System bietet die Möglichkeit, Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* zu untersuchen. Dabei macht man sich zu Nutze, dass viele eukaryotische Transkriptionsfaktoren aus zwei unabhängigen Domänen bestehen, einer DNA-Bindungsdomäne (BD) und einer Aktivierungsdomäne (AD). Im „Two-Hybrid“-System werden diese Domänen des GAL4-Transkriptionsfaktors getrennt und an zu untersuchende Proteine gekoppelt. Die entstehenden Hybrid-Proteine sind allein funktionell inaktiv und nicht mehr in der Lage, die Transkription zu initiieren. Die DNA-Bindungsdomäne kann noch an eine spezifische Promotor-Sequenz binden, aber erst durch eine Interaktion über die fusionierten Protein-Domänen kommt es zur Assoziation mit der Aktivierungsdomäne, was dann zur einer Initiierung der Transkription von nachgeschalteten Reportergenen führt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte versucht werden, mögliche Interaktionspartner von MOCS3 zu identifizieren. Dazu wurden zwei Gen-Fusionskonstrukte benötigt. Zum einen wurde die cDNA-Sequenz der MOCS3 Zielsequenz durch PCR mit den Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Sal*I versehen und in den Two-Hybrid Vektor pGBKT7 kloniert (pGBKT7-MOCS3), wobei ein Fusionskonstrukt aus GAL4-DNA-bindender Domäne und MOCS3 entsteht. Die GAL4 aktivierende Domäne wurde an eine humane Leber cDNA Bank in den Vektor pACT2 kloniert (Clontech). Für die Verwendung der humanen cDNA im Two-Hybrid System erfolgte eine Amplifikation der cDNA-Bank. Da eine Amplifikation in Flüssigkultur zu einem ungleichen Wachstum verschiedener Klone führen würde, erfolgte die Amplifikation in 150 mm Petrischalen auf LB-Selektionsmedium mit Ampicillin. Durch diese Amplifikation wurden 8×10^6 unabhängige Klone erhalten. Die Amplifikation der cDNA-Bank wurde im Agarose-Gel überprüft und eine Konzentrationsbestimmung der isolierten Plasmid-DNA am Photometer durchgeführt.

Nach Konstruktion des Zielvektos pGBKT7-MOCS3 und Amplifikation der cDNA Bank erfolgte eine sequentielle Transformation der beiden Fusionskonstrukte in den Hefestamm AH109. Für die erste Transformation wurden 3 µg der pGBKT7-MOCS3-

DNA eingesetzt. Für die zweite Transformation in den Hefestamm AH109 pGBKT7-MOCS3 wurden 50 µg cDNA-Plasmide eingesetzt. Bei der Selektion auf eventuelle Interaktionen von MOCS3 mit einem durch die cDNA Bank kodiertem Protein wurde zuerst eine mittlere Stringenz verwendet, nämlich Selektion auf die durch Interaktion der Proteine ermöglichte Histidin-Auxotrophie, sowie der Plasmid-Marker Leucin- und Tryptophan-Auxotrophie. Hierbei wurden ~ 400 Klone erhalten. Diese vorselektierten Klone wurden dann auf Selektionsplatten höchster Stringenz (Histidin-, Adenin-, Leucin- und Tryptophan-Auxotrophie, sowie X- α -Gal) überimpft und durch Wachstum und Färbung direkt als positive Klone identifiziert. Von den erhaltenen 38 positiven Klonen wurden dann die cDNA-Vektoren isoliert, in DH5 α Zellen transformiert, erneut isoliert und letztendlich sequenziert. Dies gelang für insgesamt 27 Klone und die erhaltenen DNA-Sequenzen sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst.

Von den identifizierten humanen Proteinen wurde keines mit einer solchen Häufigkeit an unabhängigen Klone gefunden, dass von einer spezifischen Interaktion ausgegangen werden kann. Dennoch kann auch durch das Auftreten eines einzelnen Klones eine *in vivo* Interaktion gegeben sein. Allerdings lässt sich zu keinem der identifizierten Proteine ein offensichtlicher funktioneller Bezug zu MOCS3 herstellen, so dass keine weiteren Versuche zur Analyse von möglichen Interaktionen der einzelnen identifizierten Proteine mit MOCS3 unternommen wurden.

Tabelle 2.1 Identifizierte Two-Hybrid Klone

Klon Nr.	Humanes Protein	Anzahl unabhängiger Klone	Datenbank Eintrag
1	Serum Albumin	3	AY728024
2	Haptoglobin	2	XP042621
3	Betaine-homocystein Methyltransferase	1	XM_003920
4	Orosomucoid 1	1	NP_000598
5	Metallothionin 2A	1	AAH07034
6	Aldehyd Dehydrogenase	1	P05091
7	Histidin-reiches Glykoprotein Precursor	1	P04196
8	Putatives Protein PRO2044	1	AAF22034
9	Beta Aktin	1	XP_037235
10	Beta-2-Glykoprotein I Precursor	1	NP_000033
11	Alkohol Dehydrogenase	1	P00325
12	Bax-Inhibitor-1	1	P55061
13	Transferrin	1	XP_002793
14	Glutathion S-Transferase	1	AAG02373
15	Ähnlich zu COMPLEMENT 3	1	XP_085870
16	Transmembran 4 Superfamilie Mitglied	1	NP_004608
17	Cathepsin B	1	XP_035662
18	Collagen Typ XVIII Alpha1	1	L22548
19	Complement Faktor B	1	NP_001701
20	Putatives ProteinMGC14141	1	BC007834
21	Fibrinogen	1	BC007030
22	Cytochrom P450 (CYP2E1)	1	NM_000773
23	Clone68-25a Ig-Heavychain	1	AF471279
24	FAM46A-Protein	1	AAH00683

2.2 Klonierung und Expression von Gesamt-MOCS3

MOCS3 wird von einem 1380 bp umfassenden Gen auf Chromosom 20 des Menschen kodiert, welches keine Introns enthält. Erste Versuche einer heterologen Expression des Proteins in *E. coli* führten ausschließlich zur Bildung von inclusion bodies. In der Folgezeit wurden verschiedenste Ansätze und Methoden angewandt, um das Protein in einer löslichen Form aufzureinigen. Dazu gehörten Rückfaltung der inclusion bodies, verschiedene Expressionsparameter (Temperatur, IPTG-Konzentration, Induktionszeitpunkt, etc.), Expression im eukaryotischen *Pichia pastoris* System (Vektor pPICZ α), Test verschiedener Tags und Fusionsproteine (N-terminaler His₆-Tag im Vektor pET15b, C-terminaler His₆-Tag im Vektor pQE60, Intein-Tag im Vektor pTYB2, Calmodulin-Tag im Vektor pCal-n, GST-Tag im Vektor pGEX-6P-1) und partielle (erste 41 Aminosäuren) bzw. komplette Entfernung (erste 52 Aminosäuren) der N-terminalen Sequenz (Abb. 2.1). Bis auf das GST-Fusionsprotein konnte durch kein weiteres System ein lösliches Protein erhalten werden.

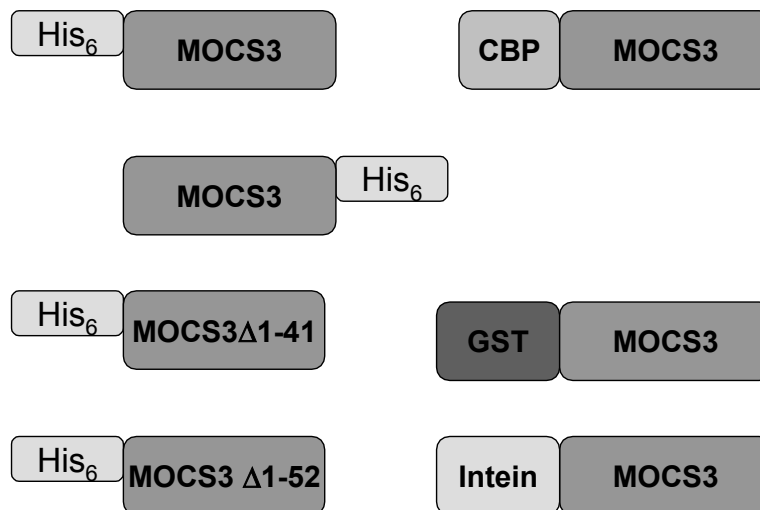


Abb. 2.1: Verschiedene Expressionskonstrukte zur Aufreinigung von MOCS3

Schematische Darstellung der klonierten MOCS3-Konstrukte zur Expression in *E. coli*. C-terminaler His₆-Tag in pET15b, N-terminaler His₆-Tag in pQE60, Chitin-bindendes Peptid (CBP)-Fusion in pCal-n, GST-Fusion in pGEX-6P-1, Intein-Fusion in pTYB2.

Zur Expression als GST-Fusion wurde das MOCS3 Gen durch PCR mit den Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Sal*I versehen und in den Vektor pGEX-6P-1 kloniert. Daraus resultiert eine Fusion der GST-Domäne an den N-terminus von

MOCS3. Die Reinigung erfolgte in einem ersten Schritt über Gluthatione fast flow Matrix (Amersham Pharmacia). Das erhaltene Eluat wurde daraufhin mit PreScission Protease (Amersham Pharmacia) inkubiert, um den N-terminalen GST-Tag abzuspalten und dann über eine Gelfiltrationssäule weitergereinigt. Die Proteinfraktionen der einzelnen Reinigungsschritte sind in Abb. 2.2 auf einem SDS-PAGE-Gel dargestellt.

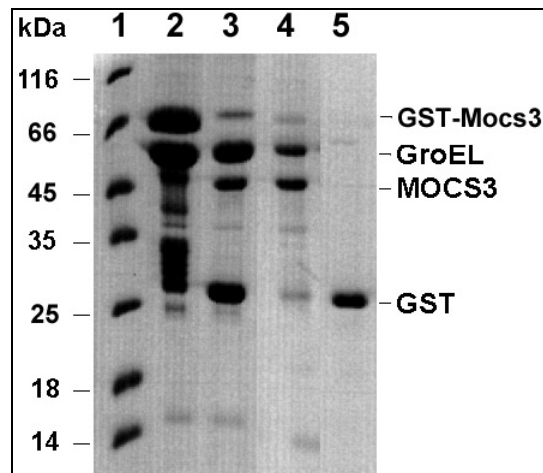


Abb. 2.2: SDS-PAGE der Aufreinigungsschritte von GST-MOCS3

Proteinfraktionen der verschiedenen Reinigungsschritte bei der Aufreinigung von GST-MOCS3 wurden auf einem 15 prozentigen SDS-Gel analysiert. Spur 1: 20 µg Proteinfraktion nach Reinigung über Glutathion fast flow Matrix, Spur 2: 15 µg Proteinfraktion nach Spaltung mit PrecissionProtease, Spur 3 + 4: 15 µg verschiedener Fraktionen der Gelfiltration, welche zum einen GroEL und MOCS3 (Spur 3) und zum anderen GST enthalten.

Nach der Elution von der Gluthation Matrix sind 2 Hauptbanden sichtbar. Eine erwartete Bande bei ~ 75 kDa (MOCS3 ~ 50 kDa + GST ~ 25 kDa) und eine zusätzliche bei ~ 60 kDa (Spur 2). Nach der proteolytischen Spaltung fällt die ~ 75 kDa Bande weg und zwei neue Banden bei ~ 50 kDa und ~ 25 kDa treten auf (Spur 3). Die Bande bei ~ 60 kDa bleibt unverändert. Bei der folgenden Gelfiltration eluieren die Proteine mit einem Molekulargewicht von ~ 60 kDa und ~ 50 kDa gemeinsam im Säulendurchbruch (Aggregat) (Spur 4) und das ~ 25 kDa Protein (GST) zu der dieser Größe entsprechenden Elutionszeit. Durch N-terminale Proteinansequenzierung (MAAKDVKFGN...) wurde die ~ 60 kDa Bande eindeutig als *E.coli* GroEL identifiziert. Die Ausbeute an MOCS3 bei dieser Reinigung lag bei ungefähr 0,5 mg pro Liter Expressionskultur wenn von einem Verhältnis von 1:1

zwischen MOCS3 und GroEL ausgegangen wird. Versuche, MOCS3 und GroEL durch höhere Salzkonzentrationen, Detergenzien oder eine beginnende Denaturierung mit Harnstoff voneinander zu trennen, schlugen bislang fehl.

2.2.1 Zink-Bestimmung von MOCS3-GST

Aus den Arbeiten zum MOCS3 homologen Protein aus *E. coli*, MoeB ist bekannt, dass es ein Zink Ion über seine beiden CXXC Motive koordiniert (Abb. 2.20). Da dieses Zink Ion sich in der Struktur von MoeB in großer Entfernung zum aktiven Zentrum befindet (Lake *et al.*, 2001) wird ihm eine wichtige Rolle in der Ausbildung der richtigen Struktur des Proteins zugesprochen. Diese beiden CXXC Motive sind in allen homologen Proteinen, einschließlich MOCS3 hoch konserviert und so ist anzunehmen, dass auch MOCS3 ein Zink-Ion zur Strukturausbildung bindet. Es sollte getestet werden, ob das Fusionsprotein GST-MOCS3 in der Lage ist Zink zu binden, oder ob das fehlende Zink vielleicht der Grund für die Instabilität und Aggregation des Proteins ist. Aus diesem Grunde wurde mit dem Fusionsprotein GST-MOCS3 der PAR-Assay durchgeführt, wobei vorher gebundenes Zink durch Denaturierung und Erhitzen aus dem Proteingelöst wird und danach durch Reaktion mit PAR (4-(2-Pyridylazo)resorcinol) nachgewiesen wird. PAR chelatiert divalente metallische Kationen und ändert dabei sein Absorptionsmaximum. Dadurch konnte anhand einer vorher erstellten Eichgerade der Zinkgehalt von GST-MOCS3 bei 500 nm bestimmt werden. Die Proteinkonzentration von GST-MOCS3 war allerdings nur auf einem SDS-PAGE-Gel abzuschätzen, da es verunreinigt mit GroEL vorlag (s.Abb.2.2). Es ergab sich für GST-MOCS3 eine Zink-Beladung von ~ 75 Prozent und es kann davon ausgegangen werden, dass fehlendes Zink nicht für die inkorrekte Faltung und Unlöslichkeit von rekombinantem MOCS3 verantwortlich ist.

2.2.2 Klonierung und Expression der Rhodanese-ähnlichen-Domäne von MOCS3 (MOCS3-RLD)

Nachdem sich herausstellte, dass die Aufreinigung des MOCS3-Gesamtproteins in hauptsächlich unlöslichem Protein resultierte, wurde versucht die beiden Protein-Domänen separat zu exprimieren und zu reinigen. Die Expression der MoeB-ähnlichen Domäne (MOCS3-MoeBD As.1-302) führte ebenfalls zu unlöslichem Protein (Vektor pET15b-MOCS3-MoeBD). Auch hier wurde versucht, durch

Abspalten der N-terminalen Leadersequenz nach Aminosäure 52 eine Löslichkeit des Proteins zu erreichen (Vektor pET15b-MOCS3-MoeBD Δ 52). Weiterhin wurden auch im Vektor pET15b-MOCS3-MoeBD einzelne Cystein-Reste (C154, C179, C193, C254) bzw. mehrere Cysteine gleichzeitig (C84, C90, C95) zu einem Serin mutiert, um somit eine Aufreinigung zu ermöglichen. Bisher ist es jedoch nicht gelungen, die MOCS3-MoeB-Domäne in löslicher Form aufzureinigen.

Im Gegensatz dazu war es möglich, die Rhodanese-ähnliche Domäne (MOCS3-RLD As. 302-460) in *E. coli* zu exprimieren und in löslicher Form aufzureinigen. Hierzu wurde die Rhodanese-Domäne über die Restriktionsschnittstellen *Nde*I und *Bam*HI in den Expressionsvektor pET15b kloniert und als mit N-terminalen His₆-Tag-Fusion heterolog in *E. coli* exprimiert. Die Aufreinigung von MOCS3-RLD ist in Abb. 2.3 dargestellt.

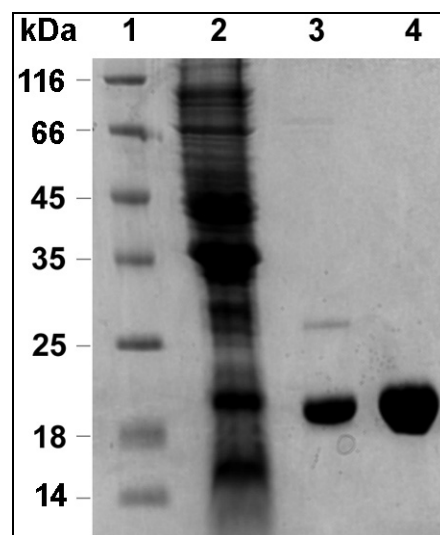


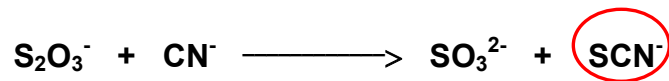
Abb. 2.3: SDS-PAGE der Aufreinigungsschritte von MOCS3-RLD

Proteinfraktionen der verschiedenen Reinigungsschritte bei der Aufreinigung von MOCS3-RLD wurden auf einem 15 prozentigen SDS-Gel analysiert. Spur 1: 30 μ g lösliche Proteinfraktion nach dem Zellaufschluss, Spur 2: 15 μ g Proteinfraktion nach Aufreinigung über NiNTA-Matrix, Spur 3: 20 μ g MOCS3-RLD nach Aufreinigung über Gelfiltration.

Nach Zellaufschluss wurde das Protein aus der löslichen Fraktion (Spur 2) über NiNTA-Affinitäts Chromatographie (Spur 3) und anschließender Gelfiltration (Spur 4) bis zur Homogenität aufgereinigt. Die Ausbeute an MOCS3-RLD lag durchschnittlich bei 7 mg pro Liter Expressionskultur.

2.3 Sulfurtransferase Aktivität von MOCS3 und MOCS3-RLD

Es ist möglich, die Sulfurtransferase Aktivität von Rhodanese-ähnlichen Proteinen *in vitro* mit dem Sörbo-Assay zu testen. Hierbei wird der Transfer des Schwefels von einer Schwefelquelle (z.B. Thiosulfat) auf Cyanid detektiert, indem das entstehende Thiocyanat als roter Eisenkomplex nachgewiesen wird.



Dieser Assay stellt somit eine erste Möglichkeit dar, zu testen, ob die Rhodanese-ähnliche Domäne von MOCS3 Sulfurtransferase Aktivität besitzt. Für die Aktivitätsmessungen wurden sowohl das GST-MOCS3 Fusionsprotein (mit GroEL verunreinigt) als auch die separate MOCS3-RL-Domäne eingesetzt. Als Schwefelquellen wurden Thiosulfat, Mercaptopyruvat und Cystein getestet. Die in Abb. 2.4 gezeigten Aktivitäten identifizieren das Enzym als eine Thiosulfat:Sulfurtransferase. Sowohl mit β -Mercaptopyruvat als auch mit Cystein war kein Thiocyanat nachweisbar.

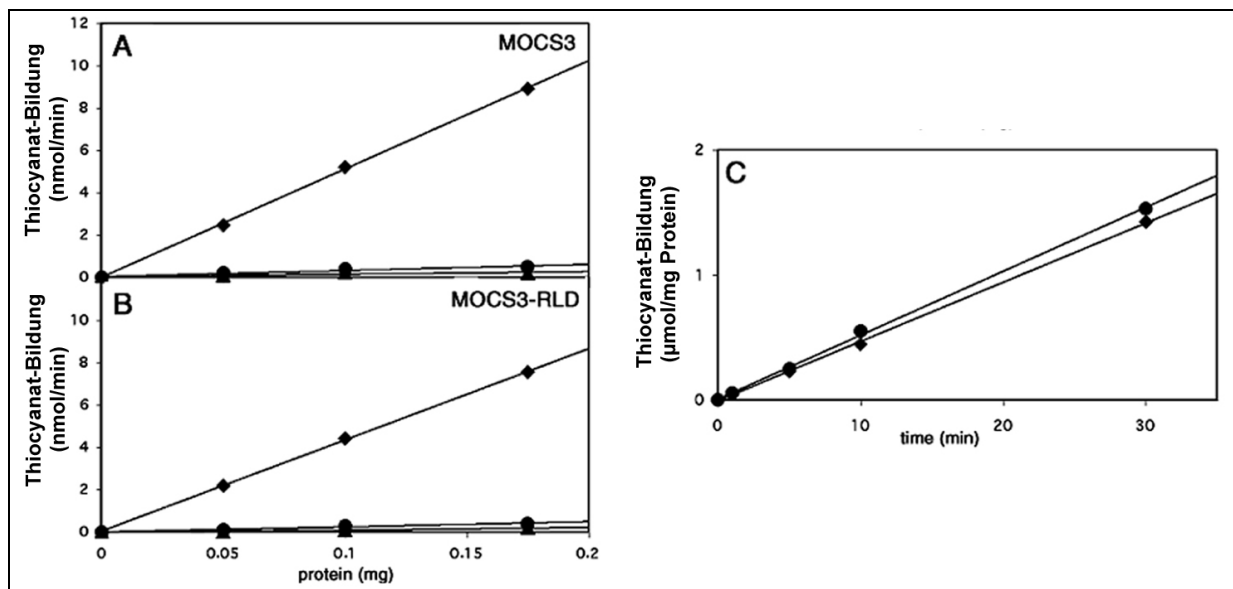


Abb. 2.4: Thiocyanat Bildung durch MOCS3 und MOCS3-RLD mit verschiedenen Schwefelquellen

(A) Abhängigkeit der Thiocyanat Bildung von der Konzentration von MOCS3 und (B) MOCS3-RLD mit 50 mM Thiosulfat (♦), 50 mM β -Mercaptopyruvat (●) und 10 mM L-Cystein (▲) als Schwefelquelle. (C) Zeitabhängigkeit der Thiocyanat Bildung katalysiert durch MOCS3 (●) und MOCS3-RLD (♦) mit Thiosulfat als Schwefelquelle.

Es zeigte sich auch, dass die Aktivitäten mit Thiosulfat von GST-Fusionsprotein und der separaten RL-Domäne kaum Unterschiede aufweisen. Dies deutet daraufhin, dass die MoeB-Domäne von MOCS3 *in vitro* nicht für den Schwefeltransfer benötigt wird. Des weiteren wurden für MOCS3-RLD die K_m -Werte für Thiosulfat mit 0,25mM und für Cyanid mit 0,28 mM bestimmt (Abb. 2.5). Im Vergleich zur Rhodanese aus *Bos taurus* ist dies ein 16 mal niedrigerer K_m -Wert für Thiosulfat und ein 4,6 mal höherer für Cyanid. (K_m -Thiosulfat 3,7 mM und K_m -Cyanid 60 μ M) (Schlesinger & Westley, 1974).

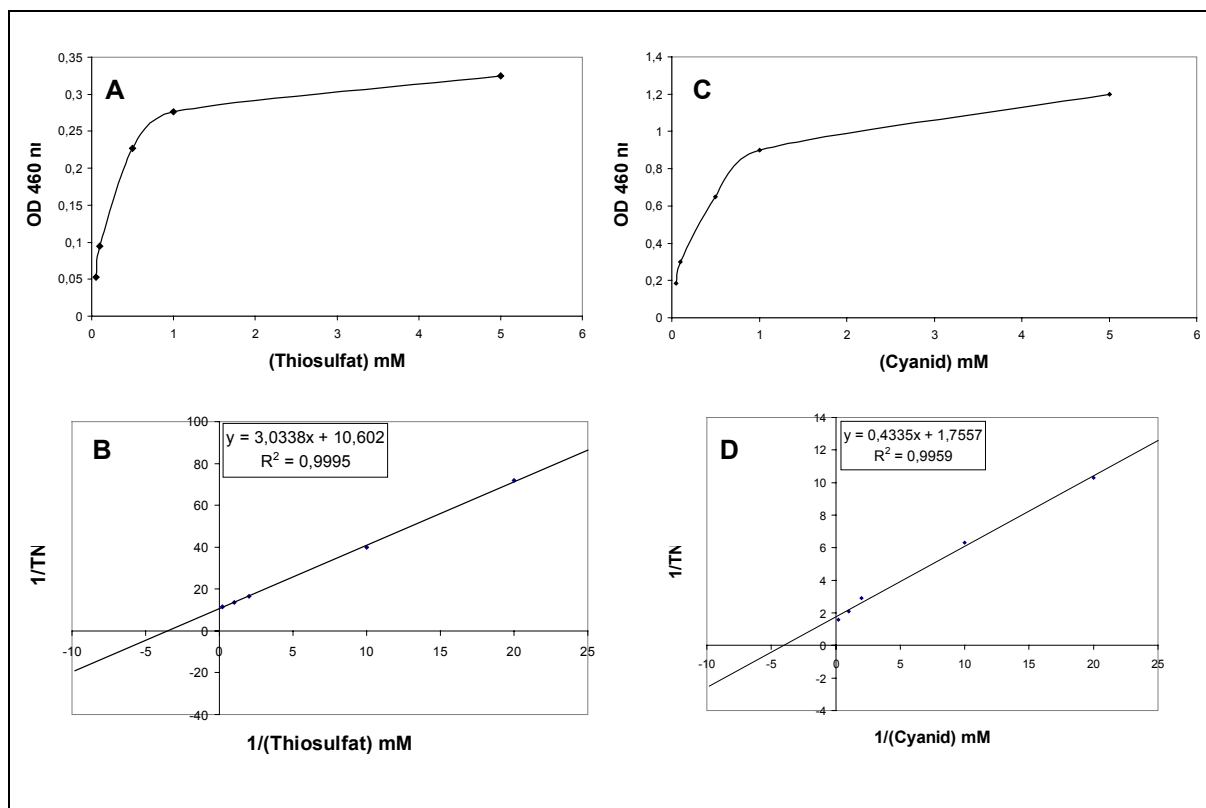


Abb. 2.5: Bestimmung der K_m -Werte von MOCS3-RLD für Thiosulfat und Cyanid

Gezeigt sind die Michaelis-Menten- (A+C) und Lineweaver-Burk-Plots (B+D) für die K_m -Werte-Bestimmung von MOCS3-RLD mit Thiosulfat (A+B) und Cyanid (C+D). Die Ansätze enthielten 30 μ g Protein und es wurden für 30 min bei den jeweiligen Thiosulfat- bzw. Cyanid-Konzentrationen die Thiosulfat-Sulfurtransferase Aktivitäten ermittelt.

2.4 Gekoppelter Rhodanese-Sulfit-Oxidase Assay

Der katalytische Mechanismus der Rhodanesen beinhaltet ein stabiles transientes Zwischenprodukt, in dem der Schwefel in Form einer Persulfid-Gruppe an das Enzym gebunden ist. Thiosulfat wird dabei zu Sulfit abgebaut und der Schwefel bleibt in Form einer Persulfid-Gruppe an dem katalytisch aktiven Cystein-Rest gebunden. Um diesen Mechanismus für MOCS3-RLD nachzuweisen, sollte das freiwerdende Sulfit durch die Aktivität der humanen Sulfit-Oxidase (SOX) zu Sulfat oxidiert werden und die frei werdenden Elektronen auf Cytochrom c übertragen werden. Das Reaktionsschema für den gesamten Versuchsansatz ist in Abb. 2.6 dargestellt.

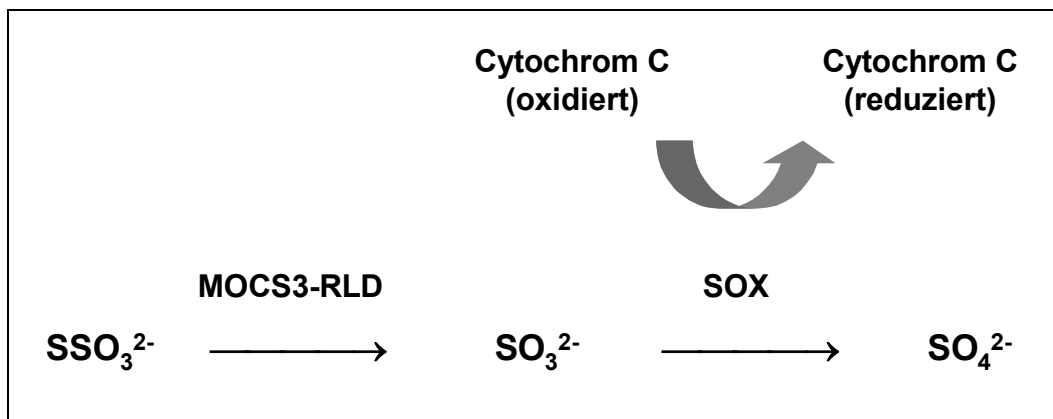


Abb. 2.6: Reaktionsschema des gekoppelten Rhodanese-Sulfit-Oxidase Assays

Es wurden je nach Ansatz (Abb. 2.7) 1 μg SOX, 400 μM Sulfit, 20 mM Thiosulfat, 30 μM Cyanid und 10 μM MOCS3-RLD in einem Gesamtansatz von 1 ml für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für die turnover Experimente mit Cyanid wurde eine sehr geringe Cyanid-Konzentration von 30 μM gewählt, da höhere Konzentrationen die Sulfit-Oxidase zu stark gehemmt hätten (G. Schwarz, persönliche Mitteilung). Danach wurde die Reaktion mit 52,5 μM Cytochrom c gestartet und die Reduktion von Cytochrom c im Photometer bei 550 nm für eine Minute verfolgt. Aus der erhaltenen linearen Steigung der Cytochrom c Reduktion wurde die Sulfit-Oxidase Aktivität errechnet und die Ergebnisse für die einzelnen Ansätze miteinander verglichen (Abb. 2.7).

Die Ergebnisse zeigen, dass bereits bei der Inkubation von MOCS3-RLD mit Thiosulfat Sulfid freigesetzt wird, wodurch eine SOX Aktivität möglich wird. Liegt in dem Ansatz zusätzlich Cyanid vor, so ist es möglich, die SOX Aktivität noch zu steigern, da MOCS3-RLD hier einen Schwefelakzeptor zur Verfügung hat und erneut mit Thiosulfat reagieren kann. Aus dem Ansatz mit SOX, Thiosulfat und MOCS3-RLD lässt sich der Anteil der aktiven Form von MOCS3-RLD ableiten. Die Absorptionsänderung in diesem Ansatz entspricht einem Umsatz von 3,7 nmol Cytochrom c. Da 10 nmol MOCS3-RLD eingesetzt wurden würde dies bedeuten, dass unter diesen Assay-Bedingungen 37 % von MOCS3-RLD aktiv waren und 63 % inaktiv. Als Hauptaussage aus diesem Experiment lässt sich allerdings festhalten, dass MOCS3-RLD ohne Anwesenheit eines Schwefelakzeptors die Umwandlung von Thiosulfat zu Sulfid katalysiert und dieses freisetzt.

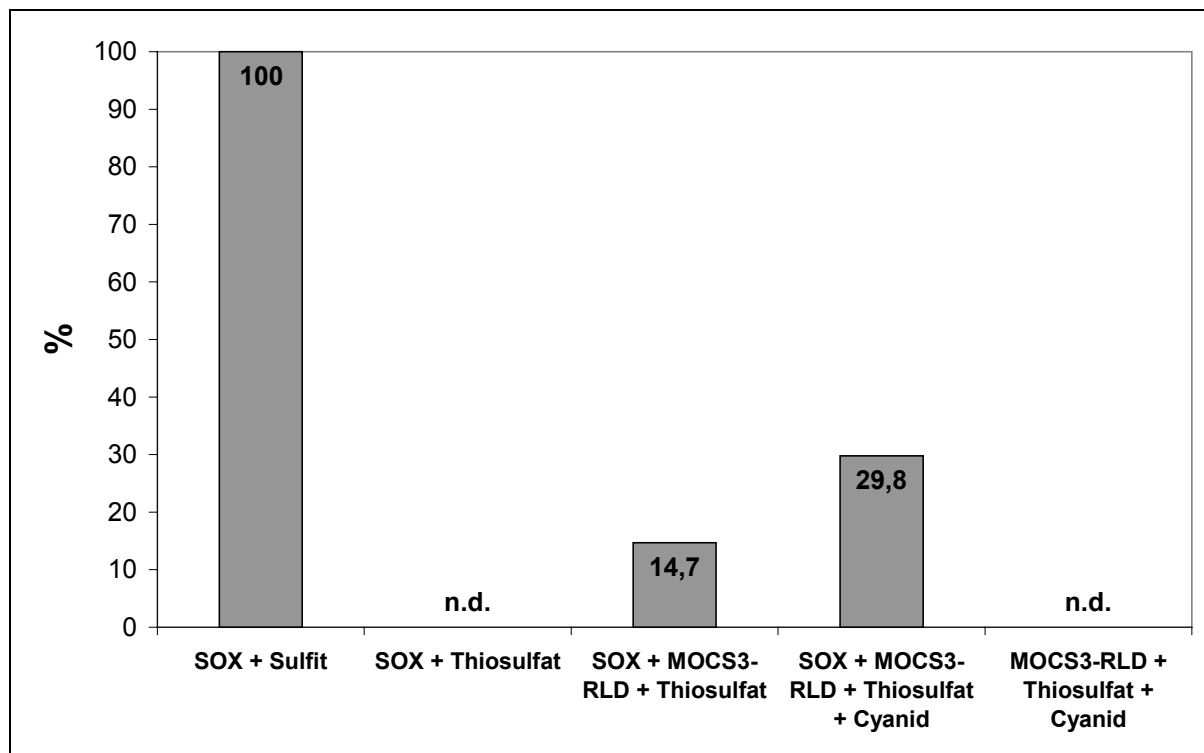


Abb. 2.7: Ergebnisse des gekoppelten Rhodanese-Sulfid-Oxidase Assays

Es wurden je nach Ansatz 1 µg SOX, 400 µM Sulfid, 20 mM Thiosulfat, 30 µM Cyanid und 10 µM MOCS3-RLD in einem Gesamtansatz von 1 ml für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mit 52,5 µM Cytochrom c gestartet und die Reduktion von Cytochrom c im Photometer bei 550 nm für eine Minute verfolgt. Die Aktivität der humanen Sulfid Oxidase mit Sulfid im Ansatz wurde gleich 100 % gesetzt. Es zeigt sich, dass MOCS3-RLD in der Lage ist aus Thiosulfat Sulfid zu produzieren, was durch die Zugabe eines Schwefelakzeptors (Cyanid) noch gesteigert wird.

2.5 *In vitro* Analysen zur Thiocarboxylierung von MOCS2A durch MOCS3 und MOCS3-RLD

Nachdem sich herausgestellt hatte, dass die RL-Domäne von MOCS3 Thiosulfat-Sulfurtransferase Aktivität besitzt, war es nun von Interesse, ob dieser Schwefel auch zur Thiocarboxylierung von MOCS2A genutzt werden kann. Hierfür wurde ein definiertes *in vitro* System zur Umwandlung von Precursor Z in MPT verwendet. Leimkühler und Rajagopalan (2001) konnten die Funktionalität dieses *in vitro* Systems, bestehend aus MoaD-OH, MoaE, MoeB, Mg-ATP, Precursor Z und einer Schwefelquelle (z.B. Sulfid) zeigen und später wurde auch die erfolgreiche Umwandlung von Precursor Z zu MPT mit thiocarboxyliertem MOCS2A (MOCS2A-SH) und MOCS2B im gleichen System gezeigt (Leimkühler *et al.*, 2003). Die MPT-Bildung in diesem *in vitro* System wird durch die Messung seines fluoreszierenden Oxidationsprodukts Form A detektiert, welches durch I₂/KI-Behandlung im Sauren entsteht.

Der Ansatz zum Test auf Thiocarboxylierung von MOCS2A durch MOCS3 bestand aus MOCS2A-OH, MOCS2B, MOCS3 (verunreinigt mit GroEL, vgl. 2.2), Mg-ATP, Precursor Z und Thiosulfat als Schwefelquelle. In diesem Ansatz konnte keine Bildung von MPT (Form A) nachgewiesen werden. Zur Überprüfung, ob die fehlende Aktivität von MOCS3 auf die Rhodanese-ähnliche Domäne oder die MoeB-Domäne zurückzuführen ist, wurde Sulfid statt Thiosulfat als Schwefelquelle eingesetzt. Auch hier konnte kein MPT nachgewiesen werden, so dass von einer inaktiven MoeB-Domäne des gereinigten MOCS3 ausgegangen werden kann (Abb.2.8A). Um dennoch die Sulfurtransferase Aktivität von MOCS3-RLD in diesem Assay zu testen, wurde versucht das humane MOCS2A-OH mit *E. coli* MoeB zu adenylieren und somit einen Ersatz für die inaktive MOCS3-MoeB-Domäne zu liefern. In diesem Ansatz gelang es mit MoeB und Sulfid als Schwefelquelle MOCS2A zu thiocarboxylieren und MPT zu bilden (Abb. 2.8B). Die erfolgreiche Adenylierung von MOCS2A-OH mit *E. coli* MoeB schaffte die Voraussetzung, die separate MOCS3-RL-Domäne im *in vitro* System einzusetzen. Hier zeigte sich, dass MOCS2A-OH, MOCS2B, MoeB, MOCS3-RLD, Mg-ATP und Thiosulfat zusammen in der Lage sind, Precursor Z in MPT umzuwandeln (Abb. 2.8D). Es konnte gezeigt werden, dass Thiosulfat alleine nicht in der Lage ist, adenyliertes MOCS2A zu sulfurieren (Abb.

2.8C) und somit die Funktion der Sulfurierung von adenyliertem MOCS2A der Rhodanase-ähnlichen Domäne von MOCS3 zugeschrieben werden.

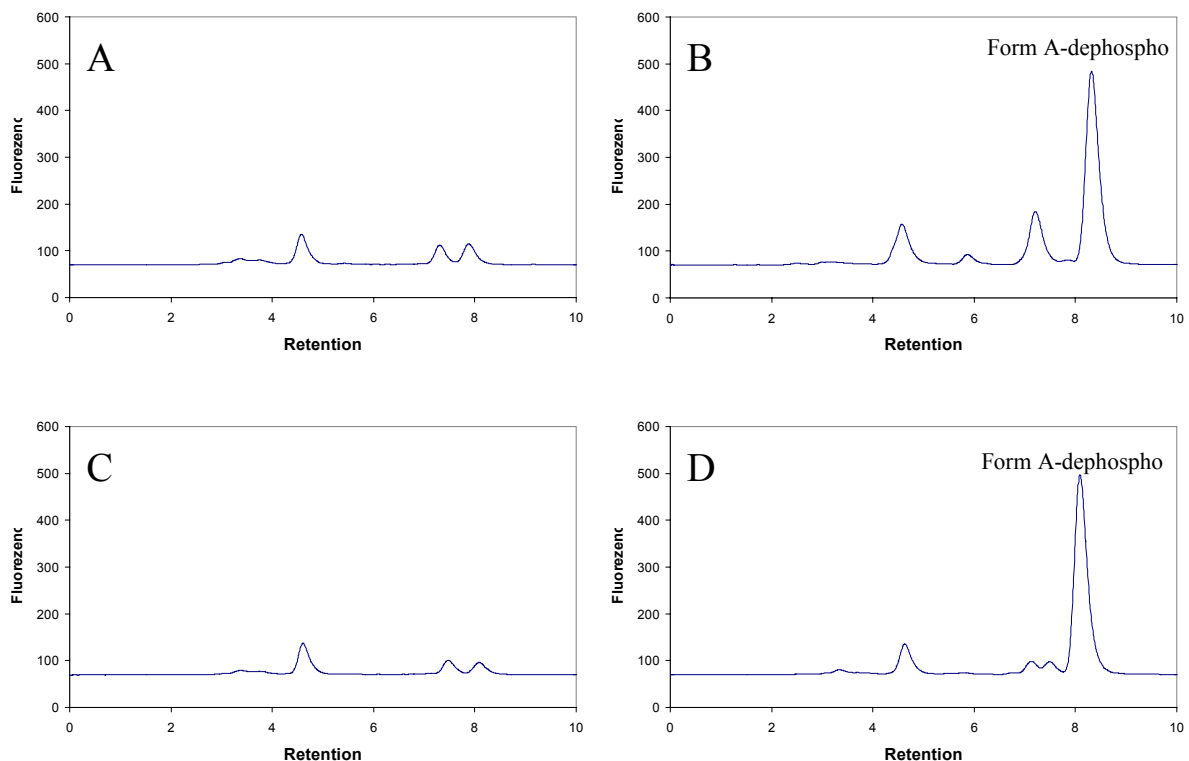


Abb. 2.8: Bildung von MPT *in vitro*

Die Fähigkeiten von MOCS3 bzw. MOCS3-RLD zur Thiocarboxylierung von MOCS2A wurden in einem *in vitro* Assay zur Bildung von MPT getestet. Alle 400 µl Ansätze in 100 mM Tris/HCl, pH 7,2 enthielten 18,6 µM MOCS2A, 3,1 µM MOCS2B, 2,5 mM Mg-ATP, 3 µM PrecursorZ und (A) 20 µM MOCS3 und 0,25 mM Sulfid; (B) 10 µM MoeB und 0,25 mM Sulfid; (C) 10 µM MoeB, und 0,75 mM Thiosulfat; (D) 10 µM MoeB, 10 µM MOCS3-RLD und 0,75 mM Thiosulfat. Nach einer Inkubation von 2 Stunden wurden die Ansätze mit 50 µl saurer I₂/KI-Lösung versetzt um gebildetes MPT in FormA umzuwandeln (Johnson *et al.*, 1984 und Leimkühler *et al.*, 2003). Dargestellt sind die Fluoreszenzen der HPLC-Elutionen.

Die Ergebnisse des gekoppelten Rhodanese-Sulfit-Oxidase Assays (2.7) wiesen bereits darauf hin, dass für MOCS3-RLD, wie bei Rhodanesen ein stabiles persulfuriertes Zwischenprodukt zu erwarten ist. Diese persulfurierte Form von MOCS3-RLD sollte im *in vitro* System ohne zusätzliches Thiosulfat eingesetzt und somit nachgewiesen werden. Dafür wurde MOCS3-RLD für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 50 mM Thiosulfat inkubiert und danach Protein- und

Um diese Annahme zu überprüfen, wurden Expressionskonstrukte von MOCS3-RLD kloniert, in welchen jeweils einer der vier Cystein-Reste gegen ein Alanin ausgetauscht wurde. Alle Konstrukte wurden in der gleichen Weise wie das Wildtyp Protein in *E. coli* überexprimiert und durch HisTag-Affinitätschromatographie und Gelfiltration bis zur Homogenität aufgereinigt. Die so erhaltenen Proteine MOCS3-RLDC316A, MOCS3-RLDC324A, MOCS3-RLDC365A und MOCS3-RLDC412A wurden im folgenden auf ihre Aktivität im Sörbo-Assay und *in vitro* bei der Bildung von MPT mit dem Wildtyp Protein verglichen.

2.6.1 Thiosulfat:Sulfurtransferase Aktivität der vier Cystein zu Alanin

Varianten von MOCS3-RLD

Mit allen 4 Cystein zu Alanin Varianten und dem Wildtyp Protein MOCS3-RLD wurde der Sörbo-Assay durchgeführt. Abb. 2.10 zeigt die Thiosulfat:Sulfurtransferase Aktivitäten von MOCS3-RLDC316A, MOCS3-RLDC324A, MOCS3-RLDC365A und MOCS3-RLDC412A im Vergleich zum Wildtyp. Die jeweiligen Aktivitäten wurden in nmol produziertes Thiocyanat pro min pro mg eingesetztes Protein berechnet.

Die Ergebnisse aus Abb. 2.10 zeigen, dass die Varianten MOCS3-RLDC316A, MOCS3-RLDC324A, MOCS3-RLDC365A Wildtyp Aktivität besitzen. Durch den Austausch von C412 gegen ein Alanin kommt es jedoch zu einem erheblichen Aktivitätsverlust, was zeigt, dass der Cystein-Rest 412 essentiell für die Sulfurtransferase Aktivität von MOCS3 ist.

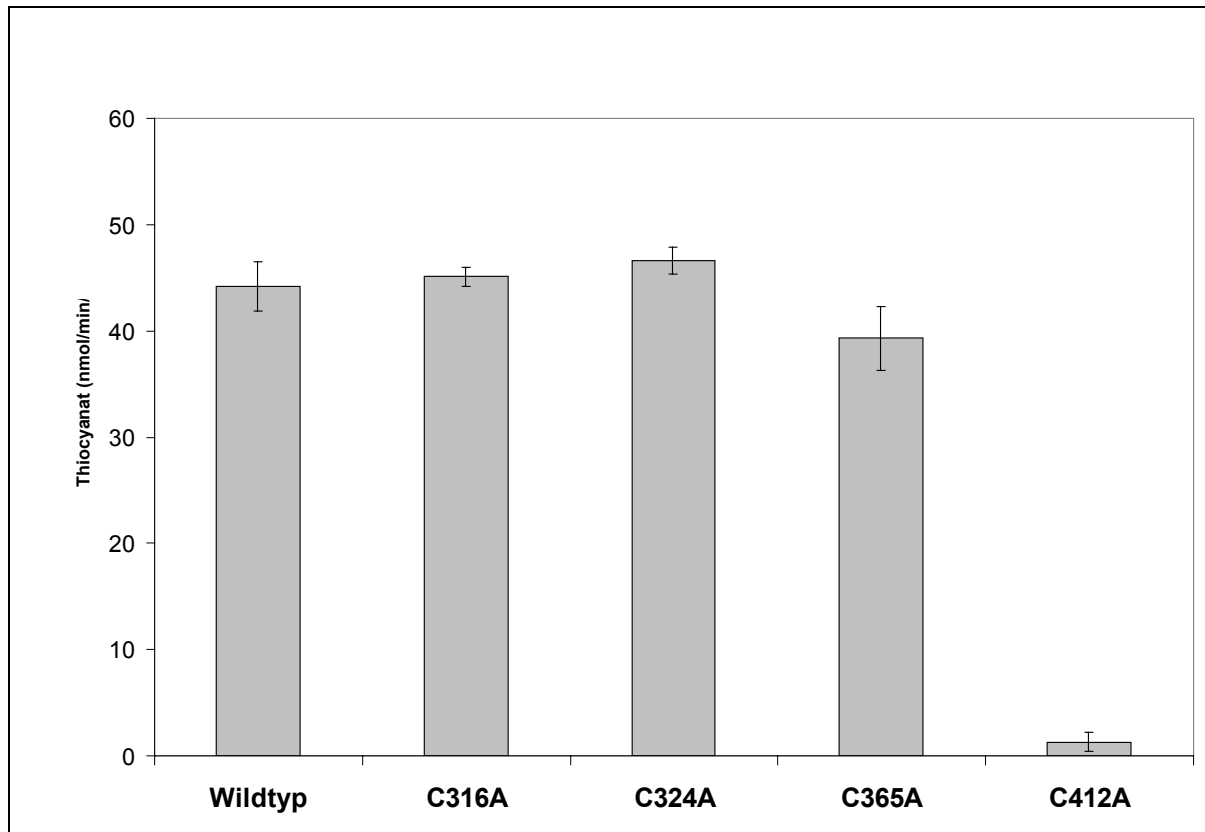


Abb. 2.10: Thiosulfat:Sulfurtransferase Assay mit MOCS3-RLD und vier Cystein zu Alanin Varianten

Jeweils 50 µg MOCS3-RLD Wildtyp, MOCS3-RLD-C316A, MOCS3-RLD-C324A, MOCS3-RLD-C365A und MOCS3-RLD-C412A wurden nach der Methode von Sörbo auf ihre Aktivität im Schwefeltransfer von Thiosulfat auf Cyanid getestet. Nach einer 30 minütigen Inkubation mit 50 mM Thiosulfat und 50 mM Cyanid wurde das entstandene Thiocyanat als roter Eisenkomplex bei 460 nm detektiert und durch eine Eichreihe quantifiziert.

2.6.2 Aktivität der vier Cystein zu Alanin Varianten bei der *in vitro*-Bildung von MPT

Nach der Analyse der Cystein zu Alanin Mutanten im Sörbo-Assay wurden die Mutanten auf ihre Fähigkeit hin untersucht, *in vitro* zur MPT-Bildung den Schwefel für die Thiocarboxylierung von MOCS2A bereit zu stellen. Für diesen Zweck wurden die aufgereinigten MOCS3-RLD Varianten mit Thiosulfat vorinkubiert und das überschüssige Thiosulfat durch Gelfiltration von der Proteinfraction getrennt. Die Ansätze zur *in vitro*-Bildung von MPT enthielten MOCS2A-OH, MOCS2B, MoeB, Mg-ATP, Precursor Z und die jeweilige MOCS3-RLD Variante in Persulfid-beladener Form. Abb. 2.11 zeigt Prozent gebildetes Form A der Varianten MOCS3-RLDC316A,

MOCS3-RLDC324A, MOCS3-RLDC365A und MOCS3-RLD-C412A im Verhältnis zum Wildtyp MOCS3-RLD (100 %).

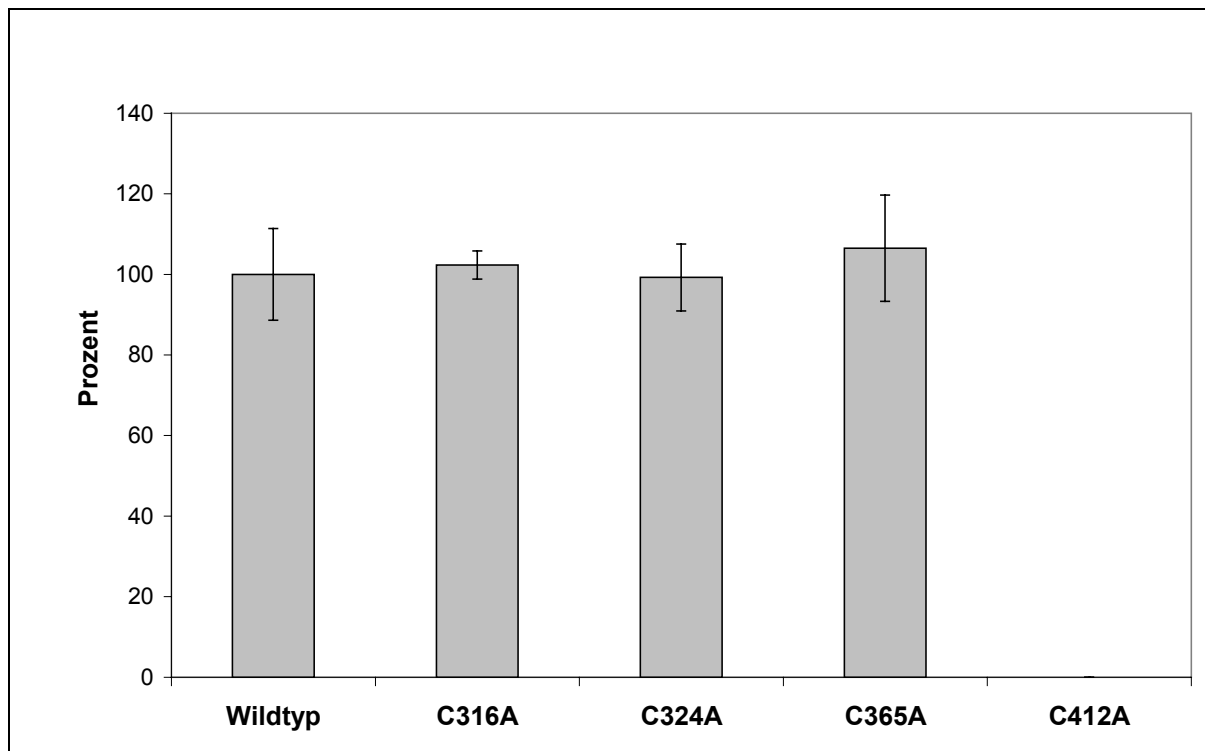


Abb. 2.11: *In vitro* Bildung von MPT mit MOCS3-RLD und vier Cystein zu Alanin Varianten

Alle Ansätze enthielten 4 μM MOCS2A, 4 μM MOCS2B, 4 μM MoeB, 2,5 mM Mg-ATP und 2,3 μM Precursor Z. MOCS3-RLD Wildtyp, MOCS3-RLD-C316A, MOCS3-RLD-C324A, MOCS3-RLD-C365A und MOCS3-RLD-C412A wurden mit 25 mM Thiosulfat vorinkubiert, über Gelfiltration von überschüssigem Thiosulfat getrennt und dann in dieser beladenen Form mit einer Konzentration von 2 μM im *in vitro* Assay zur Bildung von MPT eingesetzt.

Die Ergebnisse aus den Versuchen zur *in vitro* Bildung von MPT zeigen für die Varianten MOCS3-RLDC316A, MOCS3-RLDC324A, MOCS3-RLDC365A eine dem Wildtyp vergleichbare Aktivität. In dem Ansatz der MOCS3-RLDC412A Variante hingegen konnte kein Form A nachgewiesen werden.

2.6.3 Nitratreduktase-Overlay mit MOCS3 und MOCS3-C412A

Der Ausfall eines Gens innerhalb der Moco-Biosynthese führt zu einer inaktiven Nitratreduktase aufgrund des fehlenden Cofaktors. Die Funktionalität der Nitratreduktase kann durch das gebildete Nitrit im nicht quantitativen Overlay-Assay

nachgewiesen werden. Hierbei wird das gebildete Nitrit in einer Farbreaktion nachgewiesen, bei der es zuerst zur Diazotierung von Sulfanilsäure durch Nitrit kommt und diese dann mittels einer Azokopplung an NNEDH (N-(1-Naphtyl)-ethylen-diamin-hydrochlorid) einen pinken Farbkomplexes bildet. Vorangegangene Arbeiten haben gezeigt, dass die humane MPT-Synthase (MOCS2A und MOCS2B) nur in der Lage ist eine *E.coli* MPT-Synthase Mutante (*moaD*⁻) zu komplementieren, wenn zusätzlich MOCS3 coexprimiert wird (Leimkühler *et al.*, 2003). Dadurch eignet sich dieses System dazu, die essentielle Bedeutung des Cystein-Restes 412 für MOCS3 zu testen. Die Komplementation der *E. coli* Mutante *moaD*⁻ ist bisher nur möglich, wenn alle drei benötigten Gene hintereinander mit jeweils eigener ribosomaler Bindestelle auf einem Plasmid (pSL206) kodiert werden (Leimkühler *et al.*, 2003). Aus diesem Grund wurde in diesem Konstrukt durch PCR-Mutagenese das Cystein 412 von MOCS3 zu einem Alanin mutiert. Abb. 2.12 zeigt die Ergebnisse der Komplementation. Die humane MPT-Synthase (MOCS2A + MOCS2B) ist alleine nicht in der Lage, die Mutante zu komplementieren. Erst die Coexpression von MOCS3 führt zur Komplementation. Das Konstrukt mit der MOCS3-C412A-Mutation ist hingegen nicht in der Lage eine funktionierende Moco-Biosynthese zu gewährleisten, was die essentielle Rolle dieses Cysteins unterstreicht.

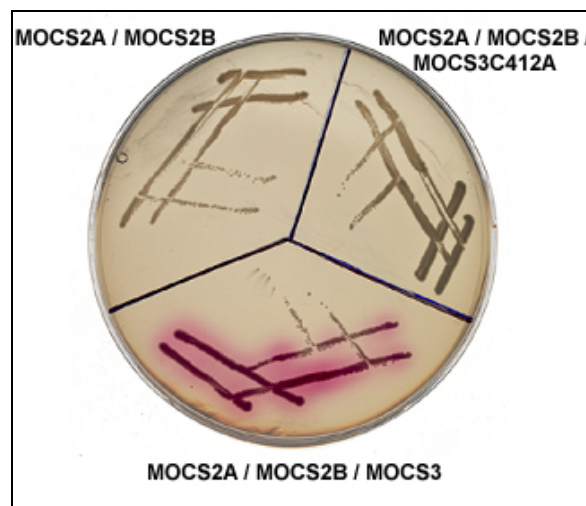


Abb. 2.12: Nitratreduktase-Overlay Assay mit MOCS3 und MOCS3-C412A

Im Nitratreduktase-Overlay Assay wurden verschiedene Expressionskonstrukte daraufhin getestet, ob sie in der Lage sind eine *E. coli* MPT-Synthase Mutante (*moaD*⁻) zu komplementieren. Getestet wurden pSL204 (Leimkühler *et al.*, 2003), welches für MOCS2A und MOCS2B codiert, pSL206 (Leimkühler *et al.*, 2003), welches für MOCS2A, MOCS2B und MOCS3 codiert und pSL206-MOCS3C412A (MOCS2A, MOCS2B und MOCS3C412A).

2.6.4 Detektion freier Sulfhydryl-Gruppen mit DTNB

Zur Identifizierung von freien Cystein-Resten in MOCS3-RLD wurden Markierungsversuche mit DTNB (Ellman's Reagenz) durchgeführt. Um eindeutige Aussagen über die tatsächlich freien Thiol-Gruppen treffen zu können, wurden insgesamt 4 verschiedene Varianten des Proteins verglichen. Hierbei handelte es sich um das Wildtyp-Protein, eine C412A Mutante, eine C316A/C324A Doppelmutante und eine C316A/C324A/C365A Dreifachmutante. Zur Identifizierung der freien Thiol-Gruppen wurden alle Protein-Varianten mit DTNB inkubiert und die entstandene 5-Mercapto-2-Nitrobenzoesäure photometrisch quantifiziert. Zur exakten Quantifizierung wurde eine Eichgerade mit verschiedenen Cystein-Konzentrationen erstellt.

Tabelle 2.2

Reaktivität von DTNB mit Sulfhydryl-Gruppen von gefalteten und ungefalteten MOCS3-RLD Varianten					
MOCS3-RLD Variante	Tatsächliche Anzahl der SH-Gruppen	Anzahl von detektierten SH-Gruppen mit DTNB ^a			
		gefaltet		ungefaltet ^d	
		+Thiosulfat ^b	+Cyanid ^c	+Thiosulfat	+Cyanid
wt	4	1,56	1,88	2,02	2,11
C316A/C324A	2	1,34	1,99	2,11	1,92
C316A/C324A/C365A	1	0,36	0,89	1,04	0,87
C412A	3	0,92	1,07	0,89	0,93

Alle Ansätze enthielten 50 mM HEPES, 200 mM NaCl, pH8,0, 10 µM MOCS3-RLD Variante und 400 µM DTNB in einem Gesamtvolumen von 1 ml. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die OD₄₁₂ bestimmt und die Anzahl detektierter Sulfhydryl-Gruppen berechnet.

^a Gesamtanzahl der gemessenen SH-Gruppen mit DTNB. Die Werte wurden durch die OD₄₁₂ mit einer Cystein-Standardkurve kalkuliert.

^b Gesamtanzahl der gemessenen SH-Gruppen mit DTNB nach Thiosulfat-Behandlung.

Überschüssiges Thiosulfat wurde vor DTNB-Zugabe durch Gelfiltration entfernt.

^c Gesamtanzahl der gemessenen SH-Gruppen mit DTNB nach Cyanid-Behandlung. Überschüssiges Cyanid wurde vor DTNB-Zugabe durch Gelfiltration entfernt.

^d Denaturierung der Proteine erfolgte durch 5 M Guanidiniumchlorid.

Wie in Tabelle 2.2 gezeigt, wurden Cyanid- und Thiosulfat-vorbehandelte Proteine im nativen und denaturierten Zustand verglichen, um detaillierte Aussagen über die Natur der Sulfhydryl-Gruppen zu machen. Auf der Oberfläche des gefalteten Proteins gelegene Sulfhydryl-Gruppen sollten dabei sowohl im nativen als auch im denaturierten Zustand detektiert werden. Im Protein verborgene Sulfhydryl-Gruppen wären hingegen nur im denaturierten Zustand nachweisbar. Unter nativen Bedingungen zeigt sulfuriertes Wildtyp MOCS3-RLD 1,56 freie Thiol-Gruppen im Gegensatz zu 1,88 Thiol-Gruppen im Cyanid-vorbehandelten Protein. Der Wert für das Thiosulfat-behandelte Protein könnte dadurch geringer sein, da die Aktivität von Persulfid-Schwefel mit DTNB geringer ist, als mit Cystein-Schwefel (Miller-Martini *et al.*, 1994). Diese Erklärung wird dadurch unterstützt, dass diese Beobachtung für alle Protein-Varianten zutrifft, bis auf die C412A-Mutante, welche keine Persulfid-Gruppe ausbilden sollte.

Die Quantifizierung der freien Thiol-Gruppen von Wildtyp MOCS3-RLD zeigt sowohl unter nativen wie unter denaturierenden Bedingungen ein Maximum von zwei pro Protein-Molekül. Dieses Ergebnis kann durch die Ausbildung einer Disulfidbrücke erklärt werden. Vergleicht man die Werte für die denaturierten Proteine in Tabelle 2.2 von Wildtyp MOCS3-RLD (2,02/2,11) mit den Werten für die Mutanten C316A/C324A (2,11/1,92) sowie C316A/C324A/C365A (1,04/0,87) so weist dies darauf hin, dass die Disulfidbrücke in MOCS3-RLD zwischen C316 und C324 gebildet wird.

2.7 Massenspektroskopische Untersuchungen an MOCS3-RLD

Die bisher gezeigten Ergebnisse haben bereits die essentielle Bedeutung des Cysteins 412 für MOCS3 gezeigt. So hat die Mutation dieses Cystein-Restes den kompletten Ausfall der Thiosulfat:Sulfurtransferase Aktivität zur Folge. Trotzdem wurde bisher noch kein direkter Nachweis für das Vorhandensein einer Persulfid-Gruppe an Cystein 412 erbracht. Aus diesem Grund wurde mit MOCS3-RLD und Cystein zu Alanin Varianten Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) und für weitergehende Analysen Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie (ESI-MS/MS) durchgeführt. Mit dieser Methode zur exakten Massenbestimmung sollte es möglich sein, den theoretischen Unterschied zwischen Schwefel-beladener und -unbeladener MOCS3-RL-Domäne von 32 Da nachzuweisen.

2.7.1 Bestimmung der Masse von MOCS3-RLD durch ESI-MS

Bei der Bestimmung der exakten Masse von MOCS3-RLD durch ESI-MS ist deutlich ein Haupt-Signal bei 19756,7 Da zu sehen (Abb. 2.13). Diese Masse ist 134 Da kleiner als zuvor kalkuliert. Aus diesem Grund wurden mit diesem Protein weitere ESI-MS/MS Spektren aufgenommen, um diese Massendifferenz auf bestimmte Fragmente des Proteins einzugrenzen. Bei diesen Messungen stellte sich heraus, dass alle detektierten N-terminalen Fragmente eine geringere Masse von 131,2 Da aufwiesen. Dies deutet darauf hin, dass das N-terminale Methionin abgespalten wurde. Dies ist für *E. coli* ein gewöhnlicher Vorgang, da die Synthese bakterieller Proteine mit einem N-Formyl-Methionin beginnt, welches in den meisten Fällen (abhängig von der folgenden Aminosäure) direkt von einer spezifischen Aminopeptidase abgespalten wird.

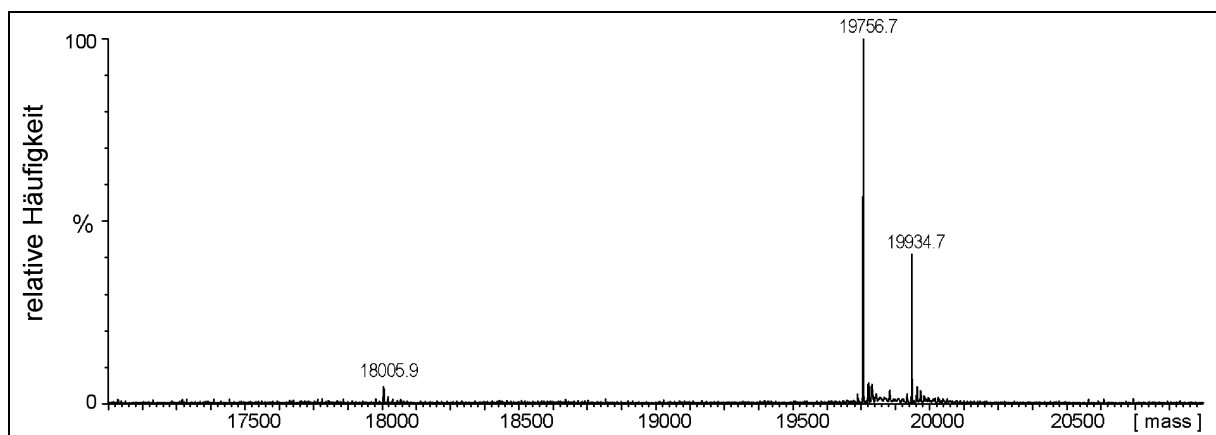


Abb. 2.13: ESI-MS Spektrum von MOCS3-RLD

Das Massenspektrum von Cyanid-vorbehandeltem MOCS3-RLD (1-10 pmol/μl) zeigt eine Hauptmasse bei 19756,7 Da und eine weitere Form mit einer Masse von 19934,7.

Die übrig gebliebene Massendifferenz von – 2,8 Da ist immer noch größer als der zu erwartende Instrumentenfehler und ist somit ein weiterer Hinweis auf eine intramolekulare Disulfidbrücke.

Es konnte noch eine zweite Form des Proteins mit einer um 178 Da erhöhten Masse detektiert werden (19934,7 Da, Abb. 2.13). Um diese weitere Proteinmodifikation, welche nur zu einem geringeren Teil nachgewiesen wurde, zu untersuchen, wurden

erneut MS/MS Analysen durchgeführt. Hierbei wurde ein Spektrum der 21 fach geladenen Ionen (Abb. 2.14a) aufgenommen und die entsprechenden Signale für das ursprüngliche Signal (Abb. 2.14b) mit dem, um 178 Da modifizierten Signal (Abb. 2.14c) durch MS/MS-Analyse miteinander verglichen. Während die C-terminalen Fragmente identisch waren, zeigten die b-Typ Fragmente (beginnend mit b8) eine um 178 Da erhöhte Masse. Die intensivsten Signale konnten für die 4-fach geladenen Ionen $b_{26} - b_{29}$ gefunden werden, welche daher in Abb. 2.14b+c gesondert hervorgehoben sind. Diese Ergebnisse deuten deutlich auf eine N-terminale Modifikation des Proteins hin.

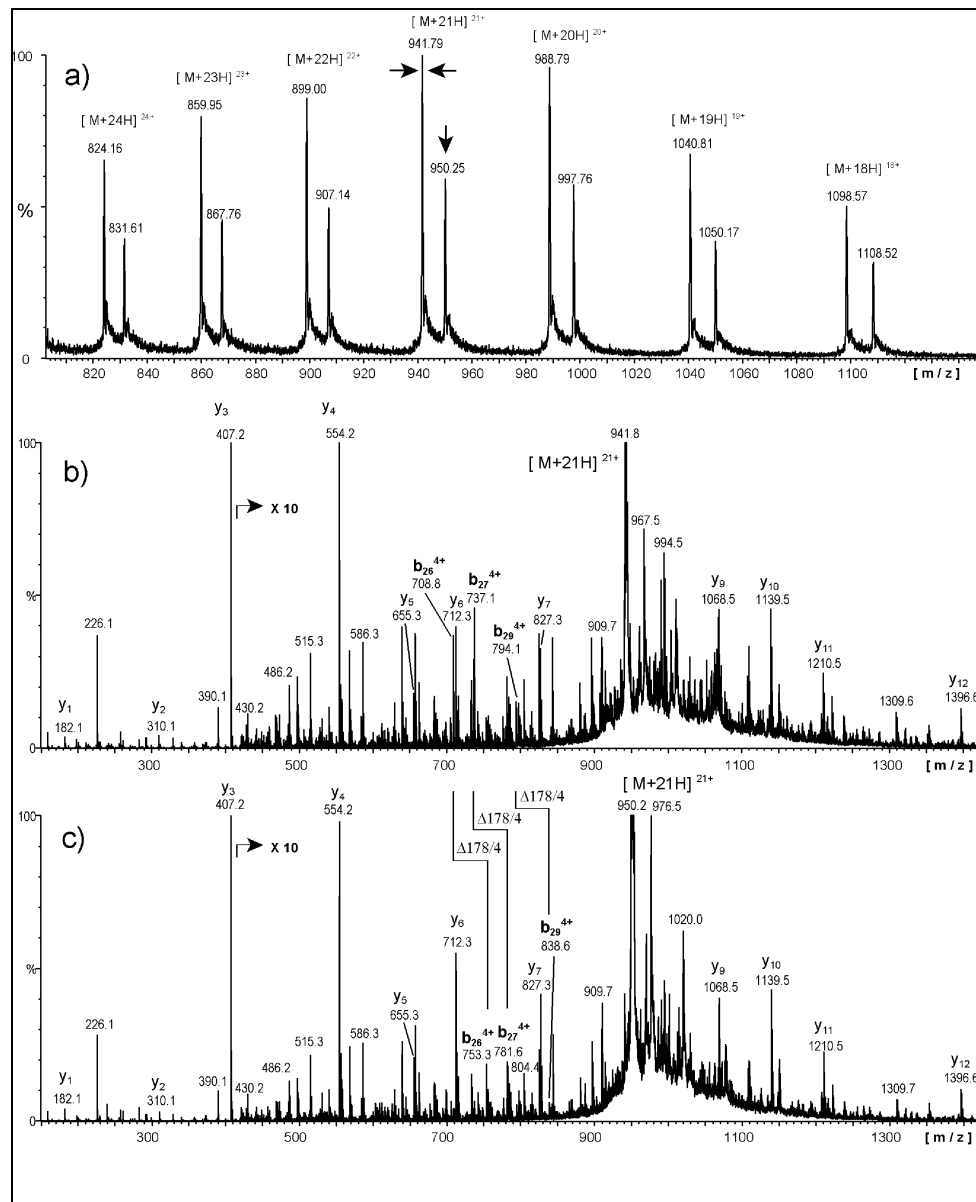


Abb. 2.14: ESI-Massenspektrum von MOCS3-RLD

(a) Doppelte Serie von mehrfach geladenen molekularen Ionen passend zu den beiden detektierten Massen in Abbildung 2.13. Die Precursor Ionen, welche für die MS/MS Experimente genommen wurden, sind mit einem Pfeil markiert. Tochter Ionen Spektrum von den 21 fach geladenen molekularen Ionen der Hauptform (b) (19756,7) und der Nebenform (c) (19934,7). Von den carboxyterminalen Fragment Ionen (y_n), welche in beiden Fällen gleich sind und somit auf einen unmodifizierten C-Terminus hinweisen, kann die erwartete Aminosäuresequenz verifiziert werden. Die schwachen, aber deutlich detektierbaren N-terminal sequenzspezifischen Fragmente (b_n) zeigen eine charakteristische Massendifferenz von 178 Da auf (markiert für die 4 fach geladenen b_{26} - b_{29} Ionen), was auf eine Modifikation am N-Terminus der Nebenform mit einer Masse von 178 Da schließen lässt. Außerdem ist die Masse der b-Typ Fragmente der Hauptform 131 Da niedriger als kalkuliert, was auf die Abspaltung des aminoterminalen Methionins hindeutet.

2.7.2 Tryptische Spaltung von MOCS3-RLD zur Entfernung des His₆-Tags

Nach der Eingrenzung der 178 Da-Modifikation auf den N-terminalen Bereich des Proteins wurde der His₆-Tag an MOCS3-RLD entfernt, um zu überprüfen, ob diese Modifikation am eigentlichen Protein oder aber am fusionierten His₆-Tag zu finden ist. Durch die Klonierung von MOCS3-RLD in den Expressionsvektor pET15b wurde die zusätzliche Sequenz MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH an den N-Terminus des Proteins fusioniert. Diese beinhaltet neben den 6 Histidinen auch eine Thrombin-Schnittstelle hinter dem Arginin. Nachdem überprüft wurde, ob MOCS3-RLD nicht noch eine weitere Thrombin-Schnittstelle enthält, wurde das aufgereinigte Protein für 16 Stunden bei 23 °C mit 1 U Thrombin pro mg MOCS3-RLD inkubiert und anschließend alle Komponenten durch Gelfiltration auf einer Superdex200 Säule voneinander getrennt. Durch das veränderte Elutionsvolumen des Proteins ohne N-terminale His₆-Tag-Fusion gegenüber dem mit N-terminaler His₆-Tag-Fusion (Abb. 2.15A) konnte bereits auf eine erfolgreiche Spaltung geschlossen werden, welche dann aber zusätzlich durch eine SDS-PAGE überprüft wurde (Abb. 2.15B).

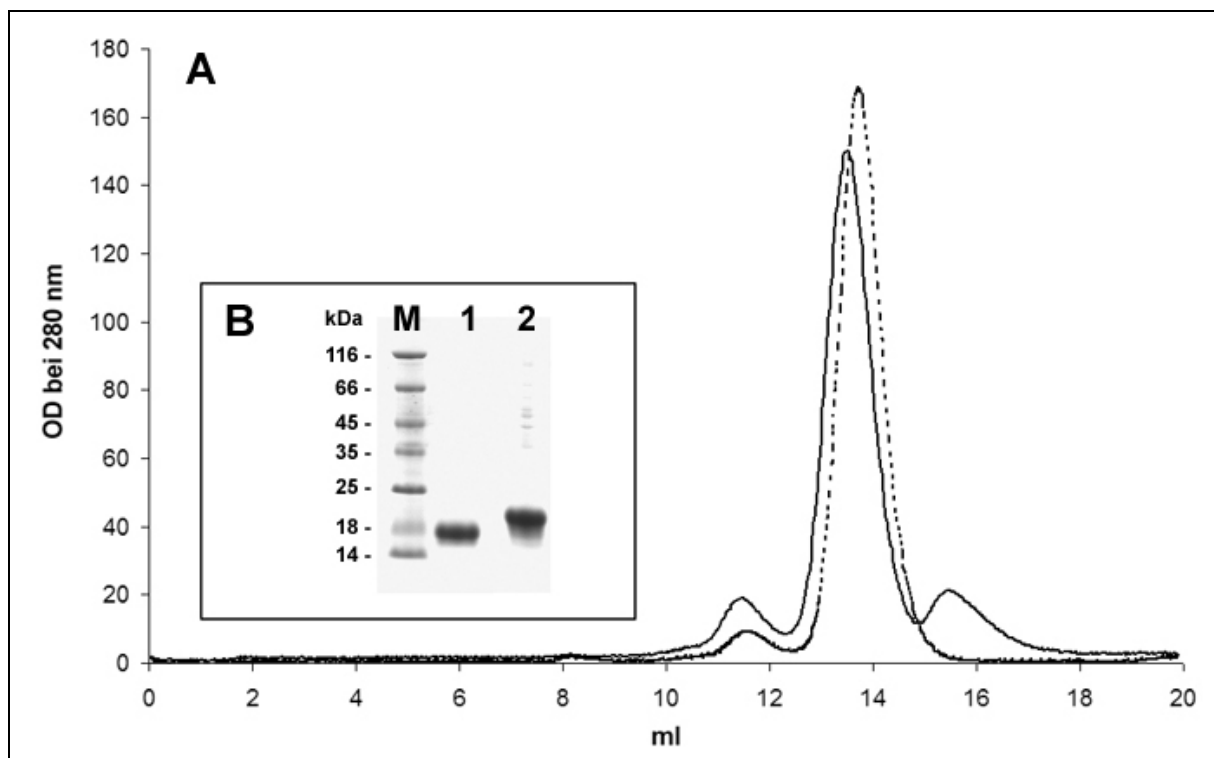


Abb. 2.15: Abspaltung des His-Tags von MOCS3-RLD

Vergleich von MOCS3-RLD vor und nach der Abspaltung des N-terminalen HisTags mit Thrombin. (A) Vergleichende Darstellung der Elutionsverhalten der beiden Proteinformen MOCS3-RLD (0,4 mg) mit HisTag (—) und ohne HisTag (---) bei einer Gelfiltration. (B) Überprüfung der erfolgreichen Spaltung in einem 15 prozentigen SDS-Gel (Spur 1: 10 µg gespalten; Spur 2: 10 µg ungespalten)

Daraufhin wurde mit dem MOCS3-RLD ohne His₆-Tag erneut eine Elektrospray-Massenspektrometrie durchgeführt. Diese ergab, dass das Protein nur noch homogen in einer Masse von 18006,1 Da vorliegt (Abb. 2.16). Dies entspricht einer Differenz zur kalkulierten Masse 18008,7 Da von – 2,6 Da, welches vermutlich wiederum auf die putative Disulfidbrücke zurückzuführen ist.

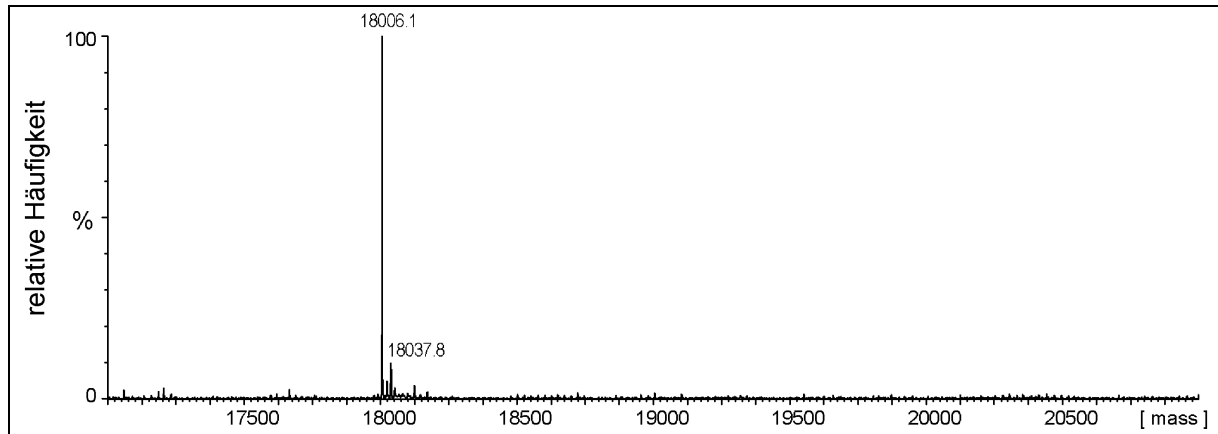


Abb. 2.16: ESI-MS Spektrum von MOCS3-RLD ohne HisTag

Das Massenspektrum von Cyanid-vorbehandeltem MOCS3-RLD ohne HisTag (1-10 pmol/μl) zeigt nur eine Hauptmasse bei 18006,1 Da und keine weitere 178 Da größere Form .

Die zusätzliche Form mit einer um 178 Da erhöhten Masse war hier nicht mehr detektierbar, so dass von einer 178 Da Modifikation am N-terminalen His₆-Tag ausgegangen werden kann. Weitere ESI-MS bzw. ESI-MS/MS Analysen des N-terminalen Fragmentes GSSHHHHHSSGLVPR konnten die Modifikation dem ersten Glycin zuordnen (Daten nicht gezeigt).

Geoghegan *et al.* (1999) konnten bereits für ein identisch exprimiertes Protein (*E. coli* BL21-Zellen, pET15b-Vektor) eine Glukonoylierung der N-terminalen GSS-Sequenz durch NMR-Analysen zeigen. Auch in diesem Fall wurde die N-terminale Aminosäure nach Abspaltung des Methionins modifiziert. Der hier vorgeschlagene Mechanismus für diese 178 Da Modifikation startet mit Glukose-6-Phosphat und führt über eine Phospho-Form der Modifikation zur entgültigen N-glukonyl-Gruppe, nachdem die Phospho-Gruppe von einer zelleigenen Phosphatase abgespalten wird. Da für die Expression für MOCS3-RLD genau das gleiche Expressionssystem verwendet wurde, die Modifikation ebenfalls auf den N-Terminus eingegrenzt wurde und die

Masse von 178 Da identisch zur beschriebenen Glukonoylierung ist, kann von einer N-Glukonoylierung von MOCS3-RLD ausgegangen werden. Auf die Sulfurtransferase Aktivität von MOCS3-RLD hat diese Modifikation keinen Einfluss, da MOCS3-RLD ohne His₆-Tag eine vergleichbare Aktivität (92 %) im Sörbo-Assay zum Protein mit His₆-Tag zeigte.

2.7.3 Detektion der Schwefelbindung von MOCS3-RLD mittels ESI-MS

Um nachzuweisen, dass während der Schwefelübertragung eine stabile Persulfid-Gruppe an MOCS3-RLD gebildet wird, sollte diese durch eine Massenzunahme von 32 Da durch Elektrospray Massenspektrometrie (ESI-MS) identifiziert werden. Dazu wurde die jeweilige MOCS3-RLD Variante für die Messungen mit Thiosulfat inkubiert. Um die Bedeutung der vier Cysteine von MOCS3-RLD für die Persulfid-Beladung zu untersuchen, wurden zusätzlich zum Wildtyp die Cystein zu Alanin Varianten MOCS3-RLD-C412A, MOCS3-RLD-C316A/C324A und MOCS3-RLD-C316A/C324A/C365A analysiert. In Abb. 2.17 sind die ESI-Spektren der verschiedenen MOCS3-RLD Varianten nach Inkubation mit Thiosulfat gezeigt. Während alle Varianten des Proteins zwei Massen mit einer Differenz von 32 Da zeigen (und die korrespondierenden glukonoylierten Formen), zeigt sich bei der C412A Variante von MOCS3-RLD keine weitere Masse.

Vergleicht man die gemessenen Massen aller MOCS3-RLD Varianten mit den kalkulierten Massen, so bestätigt sich die Annahme aus den DTNB Experimenten, dass zwischen Cystein 316 und Cystein 324 eine Disulfidbrücke ausgebildet werden könnte. Zeigen Wildtyp MOCS3-RLD und die C412A Mutante noch eine Differenz von – 2,8 bzw. – 2,7 zur kalkulierten Masse, so beträgt diese Differenz bei den Mutanten C316A/C324A und C316A/C324A/C365A nur noch -0,1 bzw. -0,2 Da. Die größere Differenz beim Wildtyp MOCS3-RLD und der C412A Variante könnte damit begründet werden, dass für die Kalkulation ihrer Massen die beiden Wasserstoffatome der Sulfhydryl-Gruppen von C316 und C324 mitgerechnet wurden. Bilden diese beiden Cysteine eine Disulfidbrücke aus, fehlen im Protein die 2 Da Masse der beiden Wasserstoffatome. Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass in den beiden MOCS3-RLD Varianten, in denen diese beiden Cystein-Reste zu Alanin ausgetauscht wurden, diese Differenz nicht mehr auftritt.

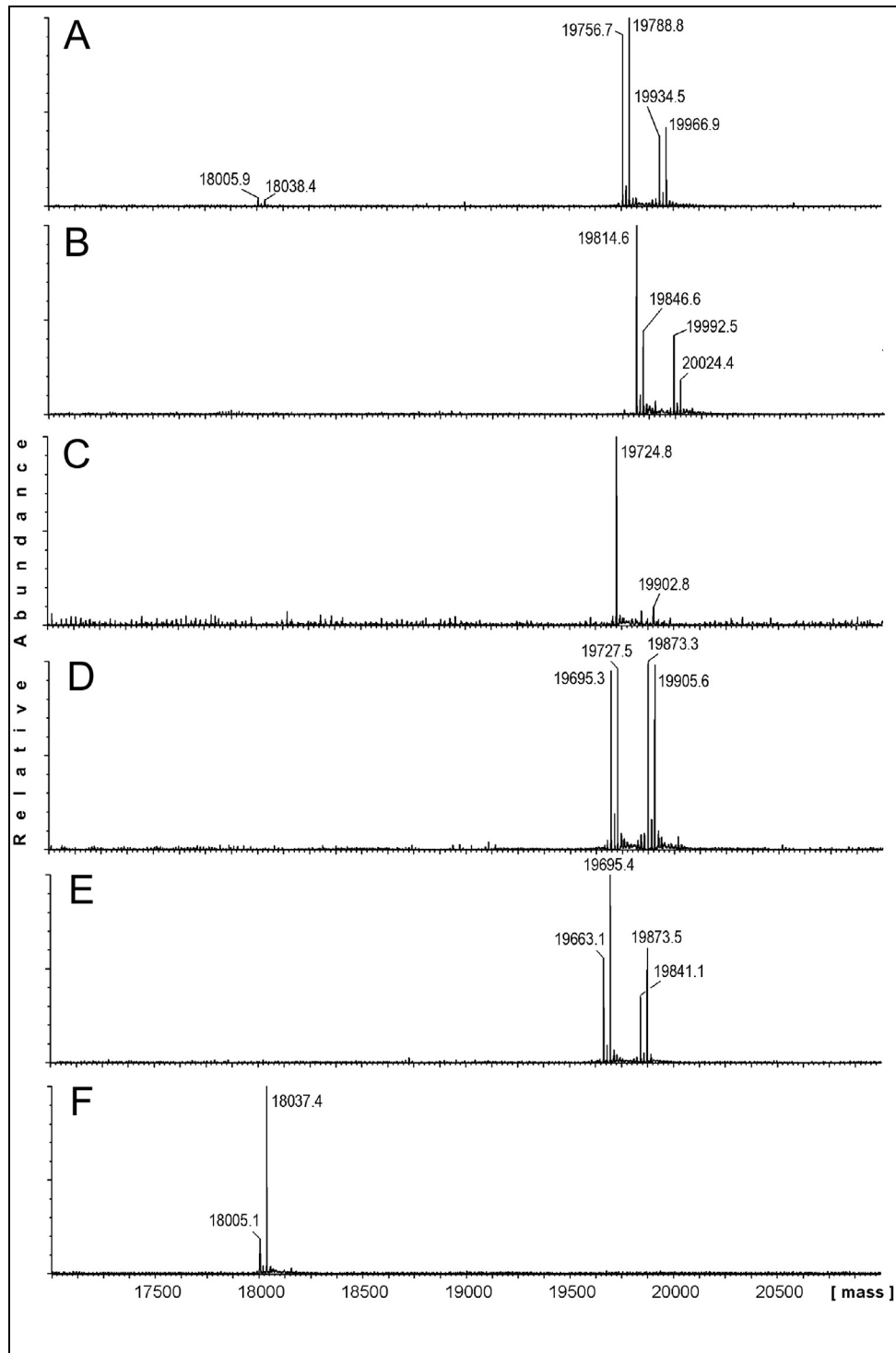


Abb. 2.17: ESI-MS-Spektren von teilweise persulfurierten MOCS3-RLD Varianten.

In Klammern sind die jeweiligen rechnerisch kalkulierten Massen angegeben. Die Proteine wurden in einer Konzentration von 1-10 pmol/μl für die Messungen eingesetzt. (A) Wildtyp MOCS3-RLD (19759,5), (B) monocarboxamidomethyliertes Wildtyp MOCS3-RLD (19816,6), (C) MOCS3-RLD-C412A mit His-Tag (19727,5), (D) MOCS3-RLD-C316A/C324A mit His-Tag (19695,4), (E) MOCS3-RLD-C316A/C324A/C365A mit His-Tag (19663,3), (F) Wildtyp MOCS3-RLD ohne His-Tag (18008,7).

2.7.4 ESI-MS/MS Analyse zum direkten Nachweis des Persulfides an C412

Um nun das Persulfid direkt am Cystein 412 nachzuweisen, wurde das Thiosulfat behandelte MOCS3-RLD tryptisch verdaut und ein ESI-MS Spektrum aufgenommen. Überraschenderweise konnten von dem Zielpeptid $_{398}\text{QGTQEGAAVPIYVICK}_{413}$ Formen mit einer Massenverschiebung von +16 Da, +32 Da und +64 Da detektiert werden. Diese zusätzlichen Formen sind teilweise dadurch zu erklären, dass es während der Methode zu Oxidationen an der Sulfhydryl-Gruppe vom Cystein gekommen ist. Die möglichen Modifikationen durch Oxidation des Cystein-Schwefels sind in Abbildung 2.18. dargestellt.

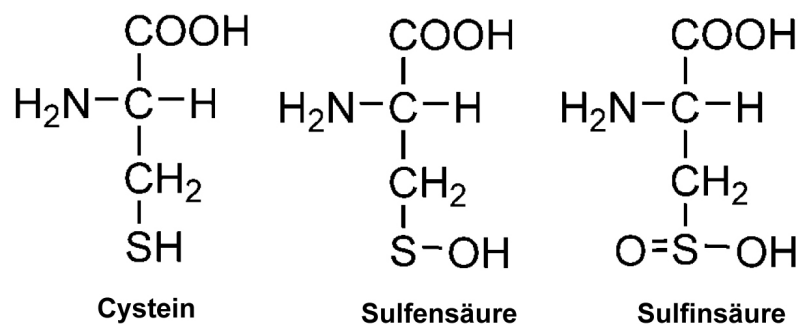


Abb. 2.18: Chemische Struktur von Cystein und möglicher Oxidationsprodukte

Eine Massenzunahme von + 64 Da ist damit allerdings nicht zu erklären, da eine Bindung von 4 zusätzlichen Sauerstoffatomen an den Cystein-Schwefel nicht möglich ist. Dies zeigt, dass hier mindestens ein zusätzlicher Schwefel am Cystein-Schwefel gebunden sein muss, welcher allerdings wiederum möglichen Oxidationen ausgesetzt wäre. Um diese Oxidation zu vermeiden, wurden die beladenen Proteine in einem weiteren Ansatz mit Iodoacetamid alkyliert. Nach tryptischen Verdau wurden dann das carboxamidomethylierte Peptid und ein Derivat mit einer um 32 Da erhöhen Masse im Verhältnis 1:1 detektiert. Analyse der Fragment Ionen der MS/MS Spektren der beiden carboxamidomethylierten Formen ergaben die erwartete Aminosäuresequenz und identifizierten den zusätzlichen Schwefel am dazugehörigen Cystein 412 (Abb. 2.19).

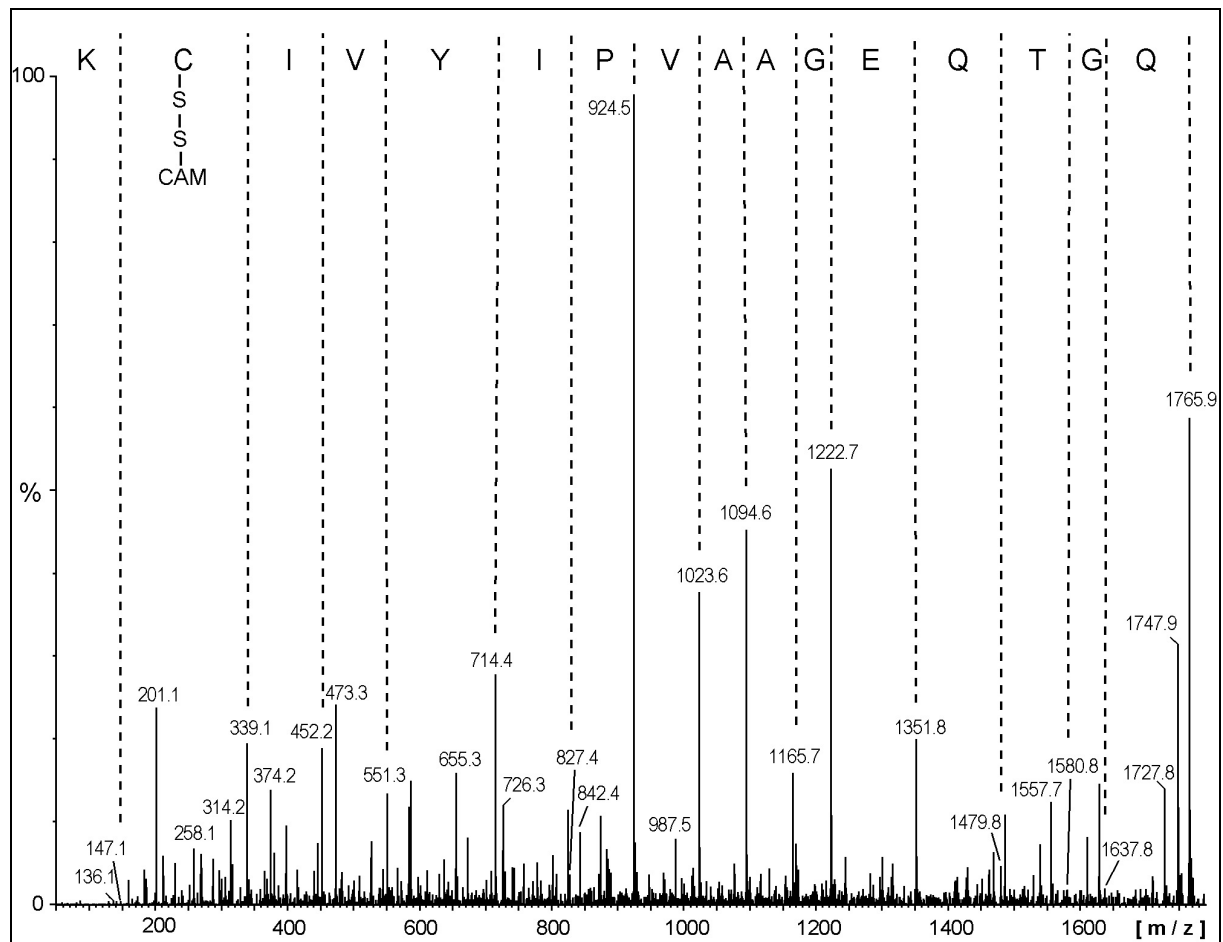


Abb. 2.19: Computer bearbeitetes (MaxEnt 3, Micromass, Manchester, UK) Tochter Ionen Spektrum des carboxamidomethylierten tryptischen C412-enthaltenen Peptids.

Dieses Spektrum zeigt die carboxyterminale Fragment Ionen Serie vom y_n Typ. Aus der Masse dieser Fragment Ionen kann die erwartete Aminosäuresequenz ermittelt werden und die carboxamidomethylierte Persulfidgruppe am Cystein Rest 412 kann gezeigt werden.

Die hierbei mögliche Oxidation eines einzelnen Cystein-Schwefels durch zwei Sauerstoffatome konnte in diesem Fall durch die hohe Mess-Genauigkeit des benutzten MS Instruments ausgeschlossen werden. Da die Massendifferenz zwischen zwei Sauerstoffatomen und einem Schwefel groß genug ist (0,018 Da), konnten wir die 32 Da Massendifferenz exakt berechnen. Hierfür wurden die klar definierten N-terminalen Fragment Ionen (b-Serie) von unserem Zielpolypeptid ohne den modifizierten Cystein Rest zur Massen Kalibrierung genutzt und auf diese Weise die exakte Masse der C-terminalen Fragment Ionen (y-Serie) mit dem darin enthaltenen

modifizierten Cystein 412 bestimmt. Auf diese Weise konnte die Persulfid-Gruppe an Cystein 412 direkt nachgewiesen werden.

Durch diese detaillierte MS/MS Analyse des tryptisch verdauten carboxamidomethylierten Proteins konnten auch die bereits beobachteten Ergebnisse für die drei übrigen Cystein Reste C316, C324 und C365 bestätigt werden. Das C316 und C324 enthaltende tryptische Peptid ²⁹⁹GSHMRPTVTDLLDYEAFCGSSATDKCR₃₂₅ wurde hauptsächlich mit einer Massendifferenz von – 2 Da zur kalkulierten Masse des underivatisierten Peptids detektiert. Nur sehr geringe Mengen des doppelt carboxamidomethylierten Peptids wurden gefunden, was wiederum die Disulfidbrücke zwischen diesen beiden Cysteinen zeigt.

Von dem tryptischen Peptid ³⁴⁴LLDSGAFHLLLDVRPQVEVDICR₃₆₆ welches das Cystein 365 enthält, wurde ausschließlich die carboxamidomethylierte Form detektiert, was keine Beteiligung dieses Cystein Restes an der Ausbildung von Disulfidbrücken zeigt.

2.8 Nitratreduktase Assays mit MOCS3 und MOCS3-C239A

Die Mutationsanalysen von MOCS3-RLD haben bisher gezeigt, dass wohl kein weiteres Cystein neben C412 eine wichtige Rolle beim Mechanismus der Schwefelübertragung spielt. Zumindest zeigten die Mutationen der drei übrigen Cysteine zu Alanin *in vitro* keinen Effekt auf die Thiosulfat:Sulfurtransferase Aktivität im Sörbo Assay und im Assay zur Bildung von MPT. Für den Mechanismus der Schwefelübertragung von MOCS3 auf MOCS2A ist die Beteiligung eines weiteren Cystein Restes aber durchaus vorstellbar, denn zur Spaltung der S-S- Bindung beim Transfer des Persulfid-Schwefels auf MOCS2A kommt eine weitere Thiol-Gruppe in Frage. Das diese Thiol-Gruppe von einem weiteren Cystein-Rest kommen kann, wurde bereits für die Biosynthese von 4-Thiouridin in *E. coli* tRNA gezeigt (Mueller *et al.*, 2001) Hierfür kommen natürlich auch die Cysteine der MoeB-Domäne von MOCS3 in Frage. In dieser Domäne gibt es 5 Cysteine, welche in allen homologen Proteinen konserviert geblieben sind (Abb. 2.20). Vier davon sind an der Koordination des Zink Ions beteiligt, so das als möglicher Rest für eine essentielle Funktion im Schwefelübertragungs-Mechanismus Cystein 239 in Frage kommen könnte. Cystein 239 ist ebenfalls in der Familie der Ubiquitin-aktivierenden Enzyme streng konserviert und hier an der Thioester Bildung mit Ubiquitin beteiligt

(Varshavsky, A., 1997). Kristallstrukturanalysen des *E. coli* MoeB-MoeB-Komplexes zeigten weiterhin, dass sich das C239 homologe Cystein 187 von MoeB in der Nähe zum Ort der Adenylierung befindet (Lake *et al.*, 2001).

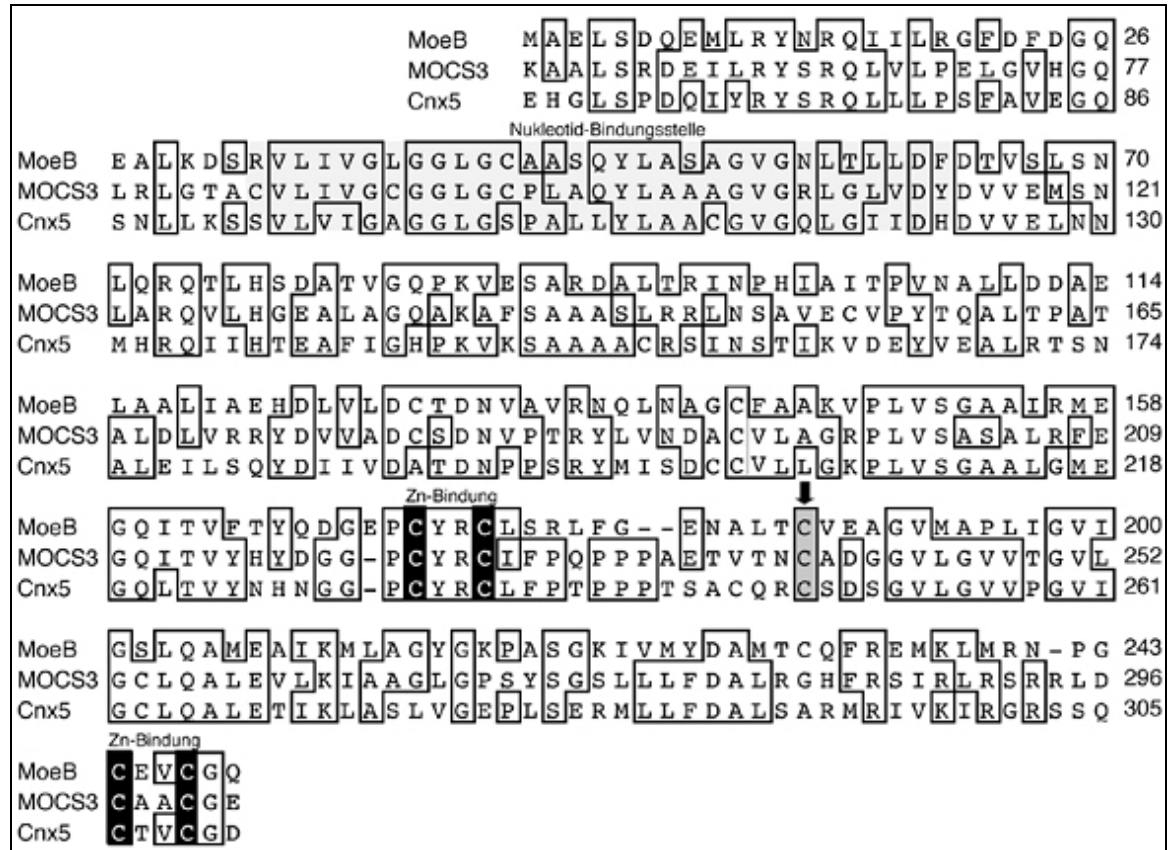


Abb. 2.20: Aminosäure-Alignment der MoeB-Domänen von MOCS3 und *A. thaliana* Cnx5 mit *E. coli* MoeB

Die Nukleotid-Bindungsstelle ist hell-grau hinterlegt. Die 4 Cystein-Reste, welche das Zink Ion koordinieren sind schwarz hinterlegt. Das hochkonservierte Cystein 239 (MOCS3) bzw. 187 (MoeB) ist mit einem Pfeil markiert.

Die Auswirkung einer Mutation von Cystein 239 für die Aktivität von MOCS3 wurde durch Komplementation einer *E. coli moeB*-Mutante in einem quantitativen Nachweis der wiederhergestellten Nitratreduktase-Aktivität getestet. Für diesen Assay wurde das jeweilige Konstrukt zur Komplementation in die *E. coli* Mutante (*moeB*⁻) transformiert und 100 µl der entsprechenden Flüssigkultur für den Nitratreduktase Aktivitätsnachweis eingesetzt, bei dem Benzylviologen als Elektronendonator im Anaeroben dient. Die Oxidation des Benzylviologens wurde dann photometrisch über die Zeit verfolgt. Um den Effekt einer Mutation von C239 zu testen wurde daher durch PCR Mutagenese das C239 von MOCS3 im Plasmid pSL 206 (MOCS2A,

MOCS2B, MOCS3) zu einem Alanin mutiert und dieses Konstrukt im Assay analysiert. Um eventuelle Unterschiede zwischen dem humanen Mechanismus zur Thiocarboxylierung der kleinen Untereinheit der MPT-Synthase gegenüber dem Mechanismus in *E. coli* aufzuzeigen, wurden auch die entsprechenden *E. coli* Proteine MoeB und MoeB-C187A zur Komplementation eingesetzt (Plasmide, Leimkühler *et al.*, 2001)

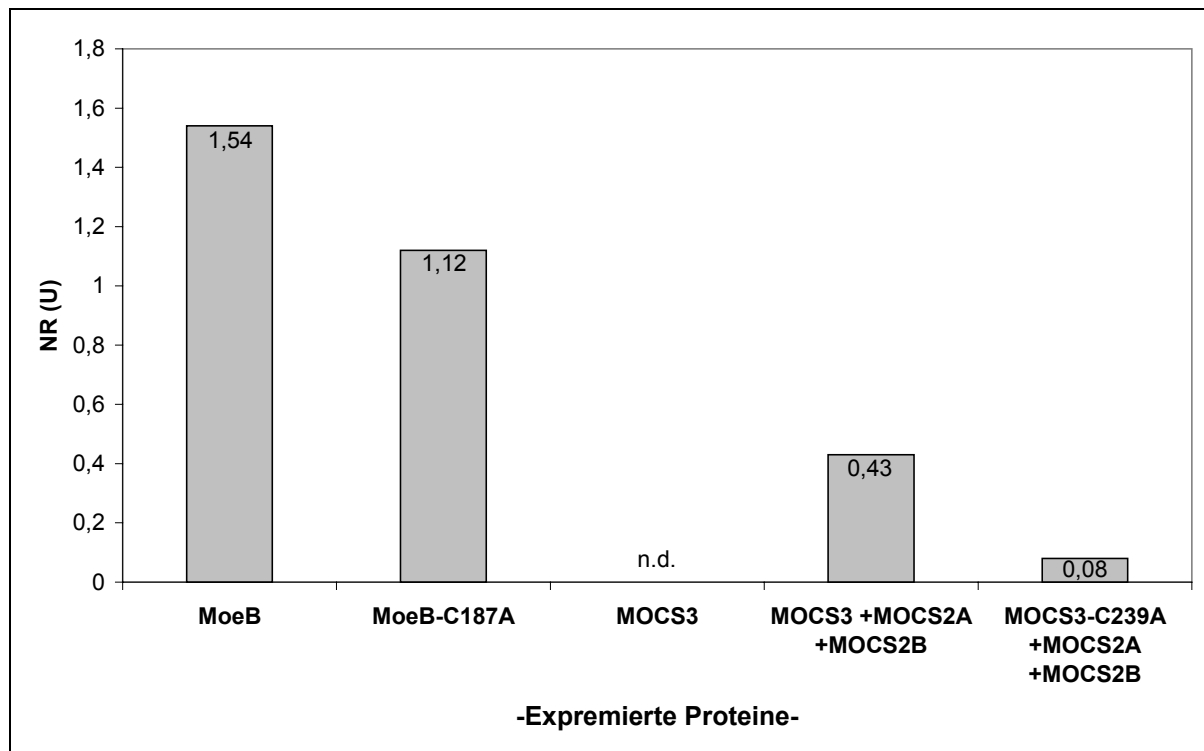


Abb. 2.21: Nitratreduktase Assay mit MOCS3-C239A und MoeB-C187A

Nitratreduktase Aktivität (U) ist dargestellt als μmol reduziertes Nitrat pro min pro mg Protein. Die *E.coli* *moeB*-Mutante wurde mit den Plasmiden pMW15eB (MoeB), pMW15eB-C187A (MoeB-C187A) (beide Leimkühler *et al.*, 2001), pSL171 (MOCS3 in pET15b ohne His-Tag), pSL206 (MOCS2A, MOCS2B und MOCS3) (Leimkühler *et al.*, 2003) und pSL206-C239A (MOCS2A, MOCS2B und MOCS3-C239A).

Die Ergebnisse in Abb. 2.21 zeigen, dass die MOCS3-C239A Variante im Vergleich zum Wildtyp MOCS3 nur 19 % der Nitratreduktase Aktivität wiederherstellen konnte und im Vergleich zu *E. coli* MoeB 5 %. Die MoeB-C187A Variante konnte hingegen im Vergleich zu Wildtyp MoeB 73 % der Aktivität wiederherstellen. Dieses Ergebnis zeigt, dass C239 eine wichtige Rolle für die Aktivität von MOCS3 spielt, wohingegen die Mutation im korrespondierenden MoeB-C187 in *E. coli* nur zu einer geringfügig reduzierten Aktivität führt.

2.9 Fusionsprotein aus *E. coli* MoeB und MOCS3-RLD

Da bisher MOCS3 nicht in einer aktiven Form gereinigt werden konnte, sollte versucht werden, ein Fusionsprotein aus *E. coli* MoeB und der RL-Domäne von MOCS3 zu erstellen (MoeB-MOCS3-RLD). Dieses Fusionsprotein sollte dann auf seine Fähigkeit hin, MOCS3 in seiner Funktion zu ersetzen, untersucht werden. Da es gelang, den Komplex aus *E. coli* MoaD und MoeB zu kristallisieren (Lake *et al.*, 2001), sollten mit diesem Protein, eine Thiocarboxylierungs-Aktivität voausgesetzt, auch Kristallisationsansätze mit MoaD durchgeführt werden. Hiermit sollten Hinweise auf die Lage der Rhodanese-Domäne im Gesamt-Komplex und somit zum Mechanismus der Schwefelübertragung gefunden werden.

2.9.1 Klonierung, Expression und Aufreinigung von MoeB-MOCS3-RLD

Als Ausgang für die Klonierung wurde das bereits bestehende Expressionskonstrukt von MOCS3-RLD verwendet. In diesem Konstrukt ist die MOCS3-RLD Sequenz über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *BamHI* in den Vektor pET15b kloniert. Daher wurde die *E. coli* MoeB Sequenz mittels entsprechenden Primern mit den Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *NdeI* durch PCR amplifiziert und über die eingebrachten Restriktionsschnittstellen in den pET15-MOCS3-RLD Vektor kloniert. Die erfolgreiche Klonierung wurde mittels DNA-Sequenzanalyse überprüft. Das fertige Expressionskonstrukt pET15-MoeB-MOCS3-RLD wurde zur heterologen Expression in *E. coli* BL21-Zellen transformiert. Nach einer Expression von 16 h bei 30 °C wurde die Zellen geerntet, aufgeschlossen und die lösliche Fraktion einer Ammoniumsulfat-Fällung unterzogen. SDS-PAGE Analysen der einzelnen Fraktionen ergaben, dass der Hauptanteil des Proteins bei einer Salzkonzentration zwischen 30 und 40 % präzipitierte. Zur weiteren Reinigung wurde diese Fraktion mittels Dialyse in einen salzfreien Puffer überführt und einer Anionenaustauscher-Chromatographie unterzogen. Die Elutionsfraktionen der Anionenaustauscher-Chromatographie wurden erneut mittels SDS-PAGE analysiert und die MoeB-MOCS3-RLD enthaltenen Fraktionen gepoolt (Abb. 2.22 Spur 1). Die gepoolten Fraktion wurden dann für eine Gelfiltration auf 2 ml ankonzentriert und auf eine Superose 12 Säule geladen. Die Elutionsfraktionen wurden erneut mittels SDS-PAGE kontrolliert, um die MoeB-MOCS3-RLD enthaltenen Fraktionen zu identifizieren (Abb. 2.22 Spur 2).

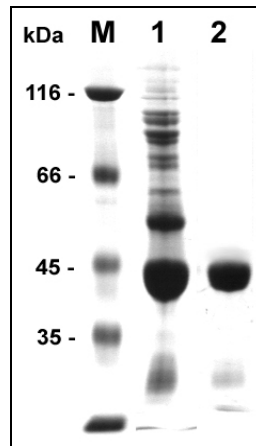


Abb. 2.22: SDS-PAGE der Aufreinigungsschritte von MoeB-RLD-Fusion

Proteinfraktionen der verschiedenen Reinigungsschritte bei der Aufreinigung von MoeB-MOCS3-RLD wurden auf einem 12-prozentigen SDS-Gel analysiert. Spur 1: 30 µg Proteinfraktion nach Reinigung über Anionenaustauscherchromatographie Spur 2: 12 µg Proteinfraktion nach Aufreinigung über Gelfiltration mit einer Superose 12 Säule.

2.9.2 Funktionalität von MoeB-MOCS3-RLD

Nach der erfolgreichen Aufreinigung von MoeB-MOCS3-RLD sollte die Funktionalität der einzelnen Domänen überprüft werden. *E. coli* MoeB liegt in seiner aktiven Form als Dimer vor. Eine Analyse der Größe per Gelfiltration mit einer Superdex200 Säule (Abb.2.23A) ergab für das Protein eine Masse von 83,2 kDa. Die kalkulierte monomere Masse von MoeB-MOCS3-RLD beträgt 44,5 kDa, so dass von einer Dimerisierung ausgegangen werden kann.

Um die Funktionalität der RL-Domäne zu testen, wurde das Protein auf seine katalytische Aktivität beim Schwefeltransfer von Thiosulfat auf Cyanid geprüft. In Abb. 2.23B ist zu sehen, dass die Proteinaktivität vergleichbar mit der separaten RL-Domäne von MOCS3 ist.

Nachdem gezeigt wurde, dass es wie im *E. coli* MoeB Protein, zu einer Dimerisierung kommt und die RL-Domäne Thiosulfat:Sulfurtransferase Aktivität besitzt, sollte nun die gemeinsame Aktivität beider Domänen im *in vitro* Assay zur MPT-Bildung getestet werden. Dazu wurde der Assay nach Protokoll mit MoaD-OH, MoaE, Mg-ATP, Precursor Z, MoeB-MOCS3-RLD und Thiosulfat als Schwefelquelle durchgeführt. Die in Abb. 2.23C dargestellte Bildung von Form A zeigt die Aktivität beider Domänen im Fusionsprotein aus *E. coli* MoeB und der RL-Domäne von MOCS3.

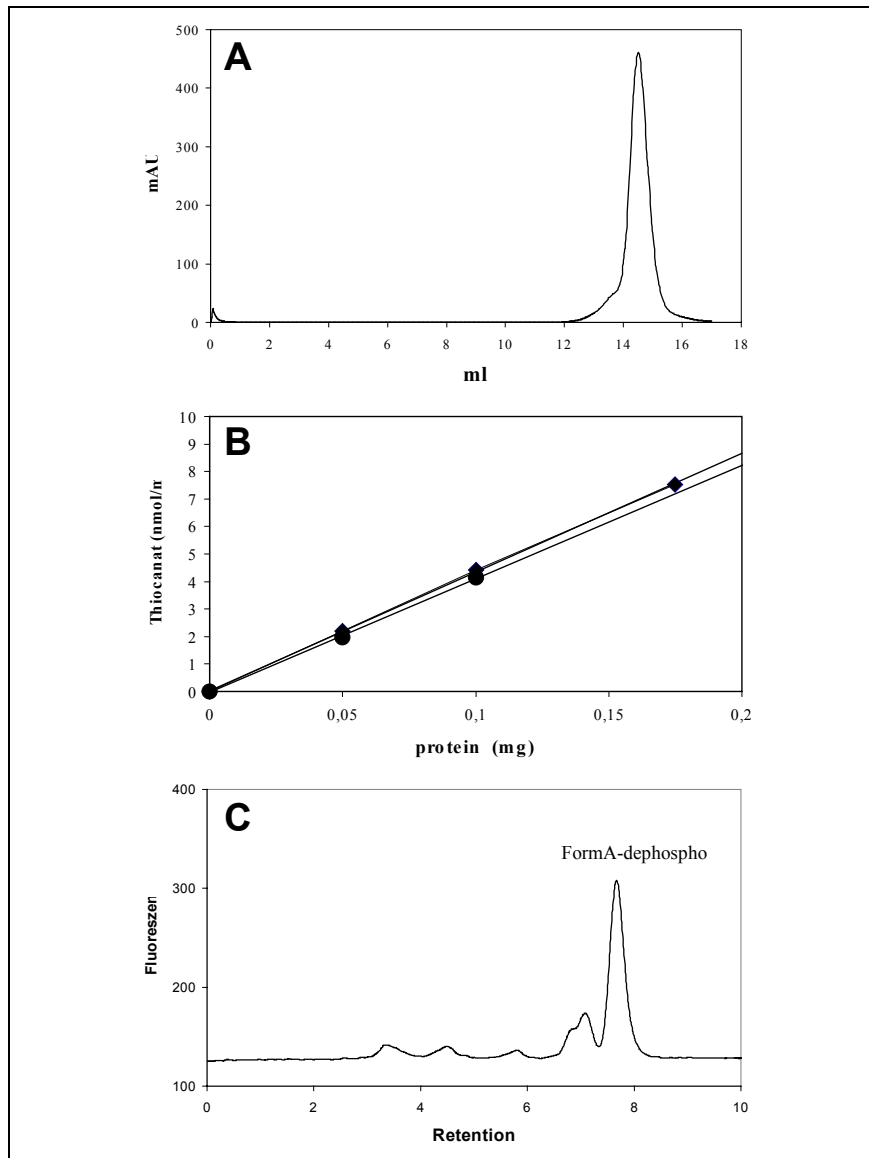


Abb. 2.23: Funktionalität des MoeB-MOCS3-RLD-Fusionsproteins

(A) Elutionsprofil von einem Gelfiltrationslauf mit 1 mg MoeB-MOCS3-RLD-Fusionsprotein. Das Elutionsvolumen entspricht einer Masse von 83,2 kDa (B) Vergleich von MOCS3-RLD mit dem MoeB-MOCS3-RLD-Fusionsprotein im Sörbo-Assay. (C) Nachweis über die Fähigkeit vom MoeB-MOCS3-RLD-Fusionsprotein im *in vitro* System zur Bildung von MPT sowohl die Adenylierung als auch die Sulfurylierung von MOCS2A zu katalysieren. 400 µl Ansatz in 100 mM Tris/HCl, pH 7,2 mit 18,6 µM MOCS2A, 3,1 µM MOCS2B, 2,5 mM Mg-ATP, 3 µM PrecursorZ, 0,75 mM Thiosulfat und 20 µM MoeB-MOCS3-RLD. Nach einer Inkubation von 2 Stunden wurden die Ansätze mit 50 µl saurer I₂/KI-Lösung versetzt um gebildetes MPT in Form A umzuwandeln. Die weiteren Schritte erfolgten nach Johnson *et al.*, 1984 und Leimkühler *et al.*, 2003. Dargestellt ist die Fluoreszenz der HPLC-Elutionen.

2.10 Humanes Nfs1

Die vorangegangenen Ergebnisse haben gezeigt, dass Thiosulfat als Schwefelquelle für den zweiten Schritt der Moco-Biosynthese *in vitro* fungieren kann. Aufgrund der geringen Enzym-Aktivität von MOCS3 mit Thiosulfat sind allerdings auch andere *in vivo* Schwefelquellen in Betracht zu ziehen. Neben weiteren niedermolekularen Schwefelverbindungen ist hierbei auch die Schwefelmobilisierung durch ein anderes Enzym möglich. In Anlehnung an die Erkenntnisse aus der *E. coli* Moco-Biosynthese und Thiamin-Biosynthese kommen als Schwefelquelle auch Cystein-Desulfurasen wie IscS in Betracht. Das homologe Protein zu *E. coli* IscS im Menschen ist Nfs1. Humanes Nfs1 wurde bisher wenig charakterisiert, da die meisten Arbeiten zu diesem Protein am homologen Hefeprotein durchgeführt wurden (Kispal *et al.*, 1999; Mühlenhoff *et al.*, 2002). Dadurch ist bekannt, dass Nfs1 in den Mitochondrien lokalisiert ist, wo es eine Funktion in der Eisen-Schwefel Cluster Biosynthese ausübt. Allerdings ist neben der mitochondrialen Lokalisation auch eine cytoplasmatische vorstellbar. Land und Rouault (1998) zeigten, dass die alternative Nutzung eines zweiten Startcodons (bp 181-183) zu einer cytoplasmatischen Lokalisation des Proteins führt. Die Funktionalität eines solchen Proteins wird allerdings durch Experimente mit dem homologen Hefeprotein widerlegt, wo gezeigt werden konnte, dass Aminosäuren, welche direkt vor dem zweiten Startcodon liegen essentiell für die Stabilität und Aktivität des Proteins sind (Mühlenhoff *et al.*, 2004). Die stabile Aufreinigung des Hefeproteins gelang mit einem N-terminal verkürzten Protein (NFS1 Δ 68, Mühlenhoff *et al.*, 2002), wohingegen die Aufreinigung des kompletten Proteins nicht möglich war. Aus diesem Grunde wurden für die Expression und Aufreinigung von humanen Nfs1 verschiedene Expressionskonstrukte gewählt.

2.10.1 Klonierung und Aufreinigung von humanem Nfs1

Für die Amplifizierung von Nfs1 aus einer humanen Leber cDNA-Bank wurden Primer anhand der Datenbank-Sequenz synthetisiert. Die Ziel-Sequenz wurde durch PCR amplifiziert, mit den Schnittstellen *Bam*HI und *Hind*III versehen und zur heterologen Expression in *E.coli* in den Vektor pQE80 kloniert. Für die Expression wurden insgesamt drei verschiedene Konstrukte mit unterschiedlichen Modifikationen im N-terminalen Bereich erstellt (Abb. 2.24).

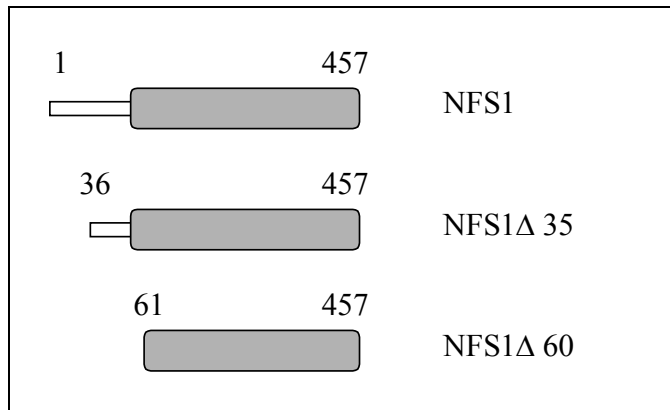


Abb. 2.24: Expressionskonstrukte von NFS1 in pQE80

Expressionskonstrukt huNfs1Δ35 entspricht dem Konstrukt der erfolgreichen Expression des HefeNfs1 Proteins (Mühlenhoff *et al.*, 2004). Das Konstrukt Nfs1Δ60 beginnt mit dem zweiten ATG in der Sequenz (Land & Rouault, 1998).

Das Protein wurde 1. in seiner vollen Länge exprimiert, 2. wurde das zweite ATG-Codon als Startcodon gewählt, da dies dem cytoplasmatisch exprimierten Protein entsprechen soll (Land & Rouault, 1998) und 3. wurde ein Konstrukt gewählt, bei dem analog zur erfolgreichen Expression des homologen Hefeproteins der N-Terminus um 35 Aminosäuren verkürzt wurde. Alle drei Konstrukte wurden in *E. coli* exprimiert und es wurde versucht die Proteine mittels His-Tag-Affinitätschromatografie aus dem löslichen Proteinanteil zu reinigen. Während es bei den beiden Konstrukten huNfs1, huNfs1Δ60 nicht möglich war, lösliches Protein von der Ni-NTA-Matrix zu eluieren, war die Aufreinigung des Konstruktes huNfs1Δ35 erfolgreich. Bei dem Versuch, das Protein weiter aufzureinigen, zeigte sich, dass es komplett in aggregierter Form vorlag (Gelfiltration) und nach kurzer Zeit auch unter verschiedensten Bedingungen (pH-Werte 4-10, Salzkonzentrationen 50-1000 mM) präzipitierte. Um eine bessere Faltung und somit eine größere Stabilität des überexprimierten Proteins zu erreichen wurde das *E. coli* Chaperon GroEL auf einem separaten Plasmid (pPH67) coexprimiert (Leimkühler *et al.*, 2003). Das auf diese Weise exprimierte Protein zeigte während der Aufreinigung eine wesentlich größere Stabilität und konnte weiter charakterisiert werden. Abb. 2.25 zeigt Proben der einzelnen Schritte der Proteinaufreinigung auf einem SDS-PAGE.

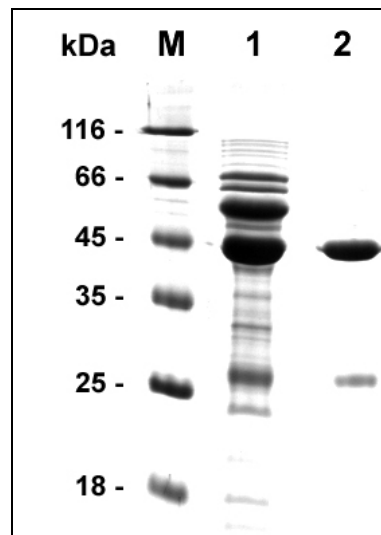


Abb. 2.25: SDS-PAGE der Aufreinigungsschritte von huNfs1

Proteinfraktionen der verschiedenen Reinigungsschritte bei der Aufreinigung von huNfs1 wurden auf einem 12-prozentigen SDS-Gel analysiert. Spur 1: 30 µg Proteinfraktion nach Aufreinigung über Ni-NTA-Matrix, Spur 2: 10µg Nfs1 nach Aufreinigung über Gelfiltration auf einer Superdex200 Säule.

2.10.2 Photometrische Charakterisierung von Nfs1

Das aufgereinigte Protein zeigte eine Gelbfärbung, welche für Cystein-Desulfurasen charakteristisch ist und auf den proteingebundenen Cofaktor Pyridoxalphosphat (PLP) zurückzuführen ist. Das aufgereinigte Nfs1 Δ 35 zeigt im UV-Vis-Absorptionsspektrum das hierfür charakteristische Absorptionsmaximum bei 420 nm (Abb. 2.26).

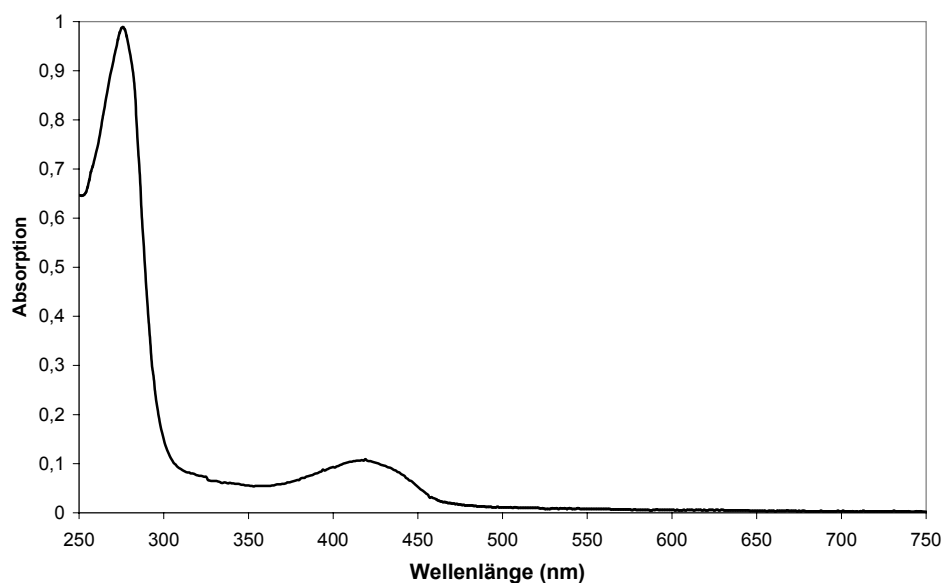


Abb. 2.26: UV-VIS Absorptionsspektrum von Nfs1 Δ 35

Wird eine Cystein-Desulfurase mit Cystein inkubiert, so kommt es im Zuge der katalysierten Reaktion zu einer Reduktion des gebundenen PLP-Cofaktors. Diese Reduktion kann photometrisch verfolgt werden, da sie eine Abnahme der Absorption bei 420 nm und eine Zunahme der Absorption bei ca. 320 nm zur Folge hat. Abb. 2.27 zeigt ein Spektrum von huNfs1 Δ 35 im ausschlaggebenden Absorptionsbereich und die Veränderung der Absorptionsmaxima als Reaktion auf die Cystein-Zugabe.

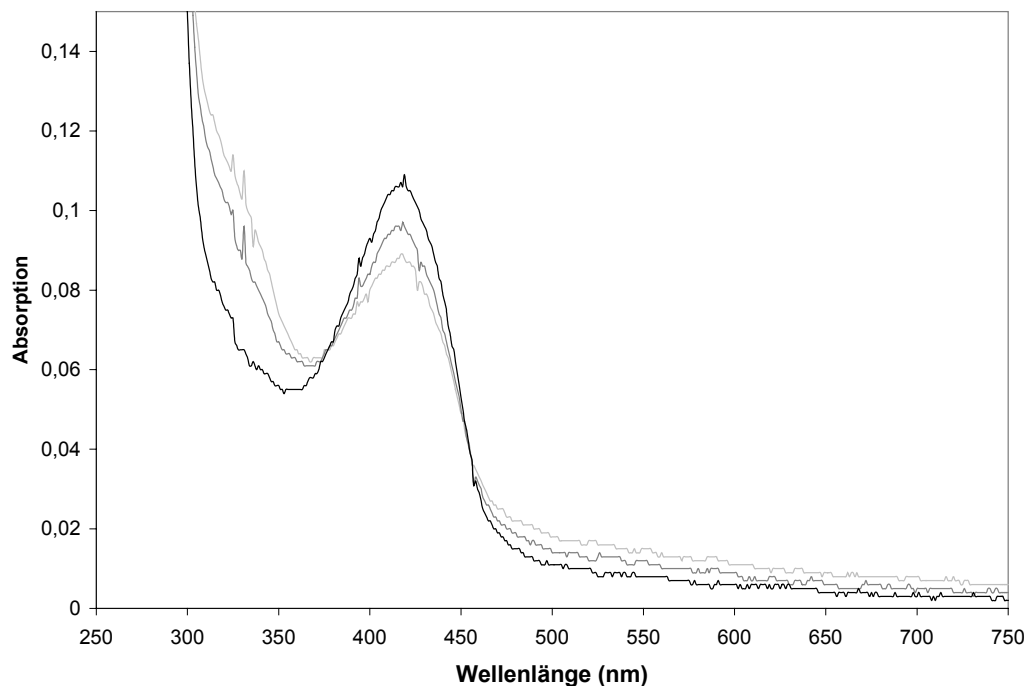


Abb. 2.27: Reduktion von Nfs1 Δ 35 durch Zugabe von L-Cystein

Die Abbildung zeigt den Ausschnitt eines Absorptionsspektrums von Nfs1 mit einer Konzentration von 1 mg/ml (—). Zu sehen ist die Veränderung der Absorption nach Zugabe von 0,1 mM L-Cystein nach einer Minute (---) und nach weiteren 0,1 mM L-Cystein und einer Minute (---).

Die Interaktion von huNfs1 Δ 35 mit L-Cystein deutet auf eine Sulfurtransferase Aktivität und daher wurde versucht, eine L-Cystein Desulfurase-Aktivität für Nfs1 Δ 35 nachzuweisen. Dies erfolgte durch den Nachweis der Übertragung des Schwefels von L-Cystein auf DTT, wobei das freigesetzte H₂S in einer Farbreaktion mittels Methylenblau-Methode nachgewiesen wird (Jaschkowitz & Seidler, 2000; Papenbrock & Schmidt, 2000). Nfs1 Δ 35 zeigte in diesem allerdings keine Aktivität.

2.10.3 Komplementation einer Hefe-Nfs1 Mutante mit humanem Nfs1

Die Reduktion von Nfs1 Δ 35 mit L-Cystein deutet auf eine Sulfurtransferase Aktivität hin, dennoch konnte diese Aktivität biochemisch für das rekombinant gereinigte Enzym noch nicht weiter charakterisiert werden (s. 2.10.2). In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Lill der Universität Marburg sollte die Funktionalität von Nfs1 Δ 35 durch Komplementation des *S. cerevisiae*-Stamm GAL-NFS1 (Mühlenhoff *et al.*, 2003) getestet werden. Zum Test der funktionalen Komplementation dieser Hefe-Mutante mit humanen Nfs1 wurde die mitochondriale Signalsequenz der F₁ β -Untereinheit aus *Neurospora crassa* an Nfs1 fusioniert und in den Hefe-Expressionsvektor p426TDH kloniert werden. Zunächst wurde das Gen für das Konstrukt Nfs1 Δ 35 mittels PCR mit den Restriktions-Schnittstellen *Hpa*I und *Xho*I versehen und über diese in den Vektor pBSCM13F₁ β kloniert. Diese führte zu einer N-terminalen Fusion der mitochondrialen Signalsequenz an Nfs1 Δ 35. Aus diesem Vektor wurde das fusionierte Konstrukt über die Restriktions-Schnittstellen *Hind*III und *Xho*I weiter in den Expressionsvektor pGAD426 kloniert. Das fertige Plasmid pGAD426huNFS1 Δ 35F₁ β wurde dann zur Komplementation in GAL-NFS1 eingesetzt. Das Ergebnis zeigt die erfolgreiche Komplementation (Abb. 2.28) des Stammes und somit die Funktionalität von Nfs1 Δ 35.

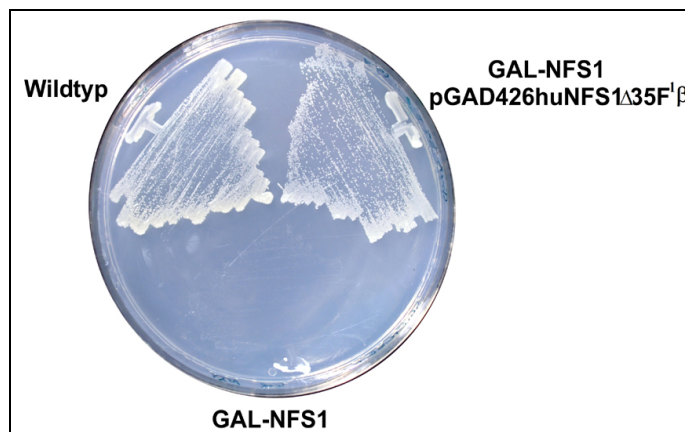


Abb. 2.28: Komplementation einer Hefe-NFS1 Mutante mit humanem NFS1

Komplementation von *S. cerevisiae* GAL-NFS1 (Mühlenhoff *et al.*, 2003) mit pGAD426huNFS1 Δ 35F₁ β . Wachstum von Wildtyp und GAL-NFS1 zum Vergleich. Zellen wurden bei 30 °C auf synthetischen Minimalmedium + Glycerol kultiviert.

2.11 Lokalisation von MOCS3, MOCS2A und MOCS2B

Die humanen Molybdoenzyme Sulfit-Oxidase, Xanthin-Dehydrogenase und Aldehyd-Oxidase sind in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle lokalisiert. Xanthin-Dehydrogenase und Aldehyd-Oxidase zeigen eine Lokalisation im Cytoplasma wohingegen die Sulfit-Oxidase im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert ist. Daher sollte die Frage nach der Lokalisation der Moco-Biosynthese analysiert werden. Alle benötigten Vektoren und Materialien für die folgenden Lokalisationsexperimente wurden von der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Jockusch zur Verfügung gestellt.

Die Gene des zweiten Schrittes der Moco-Biosynthese, *MOCS2A*, *MOCS2B* und *MOCS3* wurden in die eukaryotischen Expressionsvektoren pEGFP-N2 bzw. pEGFP-C2 kloniert. Die Klonierung in den Vektor pEGFP-N2 resultiert in einem Fusionsprotein mit N-terminalem GFP-Tag, die Klonierung in den Vektor pEGFP-C2 hingegen in einem Fusionsprotein mit C-terminalem GFP-Tag (Abb. 2.29). Alle 3 Gene wurden sowohl mit N-terminalen als auch mit C-terminalen GFP-Tag auf ihre Lokalisation getestet.



Abb. 2.29: Schematische Darstellung der verwendeten GFP-Fusionsproteine zur Lokalisation von MOCS2A, MOCS2B und MOCS3

Mit den 6 Expressionskonstrukten wurden sowohl humane Hela-Zellen, als auch die Mauszell-Linie C2C12 transient transfiziert. Die Transfektion erfolgte bei den Hela-Zellen nach der 2x HEBS-Methode, bei den C2C12 Zellen nach der HBS-Methode, welche jeweils auf Calciumphosphat Präzipitation basieren. Nach einer Expression von 18-36 Stunden wurden die Zellen fixiert und in Mowiol gebettet. Die Transfektionsrate lag für die Hela-Zellen bei ca. 50%, bei den C2C12-Zellen bei ca. 10%. In Abbildung 2.30 sind beispielhaft für jedes Protein die typischen Fluoreszenzmuster gezeigt.

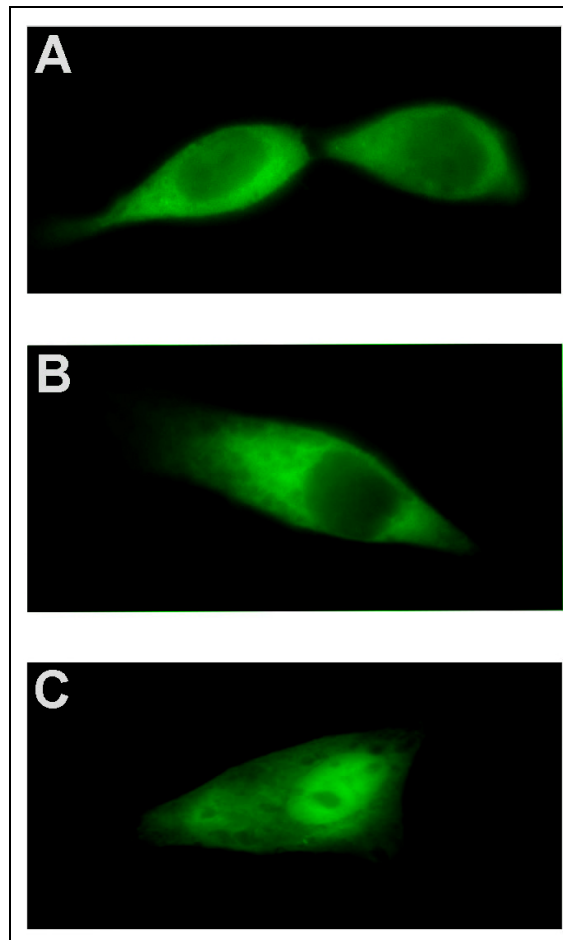


Abb. 2.30: Lokalisation von MOCS2A, MOCS2B und MOCS3 in HeLa-Zellen

Fluoreszenz Aufnahmen nach Expression von (A) MOCS3, (B) MOCS2B und (C) MOCS2A als C-terminale GFP-Fusion in transfizierten HeLa-Zellen. Die Fluoreszenz Aufnahmen wurden mit einem konventionellen Lichtmikroskop ausgerüstet mit Epifluoreszenz erstellt (Axiophot, Zeiss)

Alle drei Proteine zeigen sowohl mit N-terminaler, wie auch mit C-terminaler GFP-Fusion eine Lokalisation im Cytoplasma. Es zeigte sich kein Unterschied der Lokalisation zwischen humanen HeLa-Zellen und murinen C2C12-Zellen. Bei MOCS2A ist neben der Lokalisation im Cytoplasma zusätzlich eine Lokalisierung des Proteins im Kern zu beobachten. Hierbei könnte es sich um eine unspezifische Lokalisation, da das MOCS2A-GFP Fusionsprotein nur eine Größe von 36 kDa hat und dadurch ein unspezifischer Transport in den Kern möglich ist.

Im Gegensatz zu MOCS2A und MOCS2B konnte bei MOCS3 nach längerer Expressiondauer eine Aggregation des Fusionsproteins beobachtet werden. Des Weiteren führte eine längere Expression der beiden MOCS3-Konstrukte zu einem Absterben der Zellen. Dieser Vorgang ist in Abbildung 2.31 dargestellt.

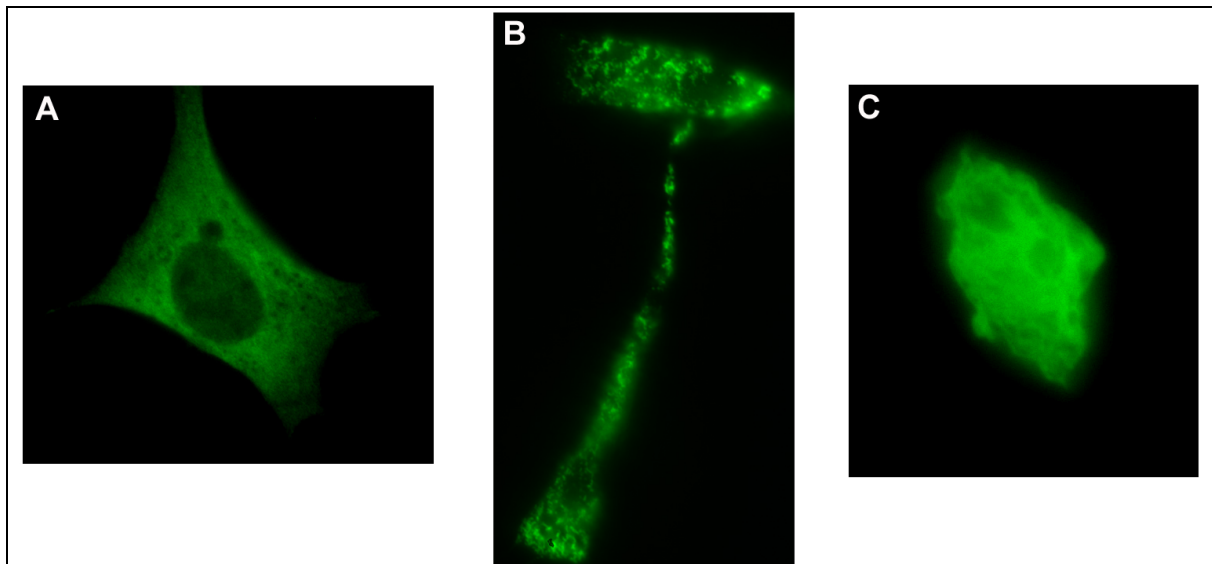


Abb. 2.31: Zeitabhängige Aggregation von MOCS3-GFP in C2C12-Zellen

Fluoreszenz Aufnahmen nach Expression von MOCS3 als C-terminale GFP-Fusion in transfizierten C2C12-Zellen. Dargestellt sind Fluoreszenz Aufnahmen nach 18 (A), 24 (B) und 36 (C) Stunden, wobei es zu einer immer stärkeren Aggregation des Fusionsproteins und schließlich zum Absterben der Zellen kommt. Die Fluoreszenz-Aufnahmen wurden mit einem konventionellen Lichtmikroskop, ausgerüstet mit Epifluoreszenz erstellt (Axiophot, Zeiss)

Um eine Co-Lokalisation von zwei Proteinen in einer Zelle zu untersuchen, ist es nötig sie mit unterschiedlichen Tags zu versehen. Daher wurde von MOCS3 noch ein zusätzliches Fusionsprotein mit einem Flag-Tag kloniert. Bei einem Flag-Tag handelt es sich um eine kurze Aminosäuresequenz, welche hochspezifisch von einem Anti-Flag-Antikörper erkannt wird. Dieser Antikörper ist mit einem rot-fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt und ermöglicht so eine Unterscheidung zwischen GFP-fusionierten Protein (grün) und Flag-fusionierten Protein (rot). MOCS3 wurde zu diesem Zweck durch PCR mit den Restriktionsschnittstellen *HindIII* und *BamHI* versehen und in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3 kloniert. In diesem Vektor lag bereits die Flag-Sequenz nach der *BamHI*-Schnittstelle vor, so dass diese Klonierung zu einem C-terminalen Flag-Tag an MOCS3 führte. Für die Co-Lokalisationsexperimente wurden ausschließlich HeLa-Zellen verwendet, da hier die Transfektions-Effizienz wesentlich höher als bei den C2C12-Zellen war und dies für eine Co-Transfektion besonders wichtig ist. Die Ergebnisse aus den Co-Lokalisationsexperimenten von MOCS3 mit MOCS2A und MOCS3 mit MOCS2B sind in Abb. 2.32 gezeigt. In beiden Experimenten war es möglich, doppelt transfizierte

Zellen zu finden. Die Proteine sind in allen Ansätzen im Cytoplasma lokalisiert. Für MOCS3 und MOCS2A ist zu beobachten, dass die Anwesenheit von MOCS3 in der Zelle nicht den Transport von MOCS2A in den Kern verhindert (Abb. 2.32B+C). Bei den MOCS3/MOCS2B transfizierten Zellen (Abb. 2.32D+E) ist im Gegensatz zur separaten Transfektion mit MOCS2B zu beobachten, dass MOCS2B auch eine Aggregation zeigt. Diese Aggregate scheinen aber keine Co-Aggregate mit MOCS3 darzustellen, da keine verstärkte rote Fluoreszenz in diesen zu beobachten ist.

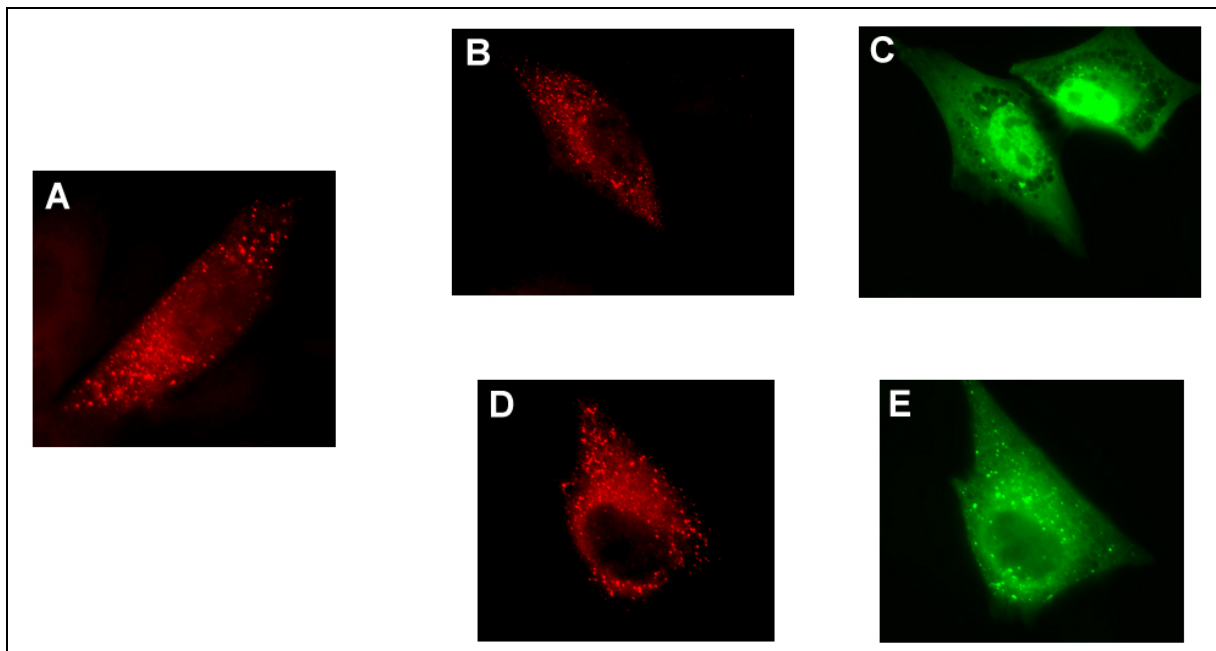


Abb. 2.32: Co-Lokalisation von MOCS3 mit MOCS2A und MOCS2B

(A) Fluoreszenz Aufnahmen nach Transfektion mit MOCS3-FlagTag. (B+C) Fluoreszenz Aufnahmen des gleichen Zellausschnittes nach Co-Transfektion mit MOCS3-FlagTag (B rote Fluoreszenz) und MOCS2A-GFP (C grüne Fluoreszenz). (D+E) Fluoreszenz Aufnahmen des gleichen Zellausschnittes nach Co-Transfektion mit MOCS3-FlagTag (D rote Fluoreszenz) und MOCS2B-GFP (E grüne Fluoreszenz). Die Fluoreszenz Aufnahmen wurden mit einem konventionellen Lichtmikroskop aufgerüstet mit Epifluoreszenz erstellt (Axiophot, Zeiss)

3. Diskussion

3.1. Interaktionspartner von MOCS3

Für die Suche nach zusätzlichen Interaktionspartnern von MOCS3 wurde das Yeast-Two-Hybrid System verwendet. Es stellt eine Methode dar, um *in vivo* unter verschiedenen Proteinen nach Wechselwirkungen zu suchen. Ein Vorteil bei der Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen mit dem Yeast-Two-Hybrid System liegt darin, dass die Proteine nicht gesondert überexprimiert und aufgereinigt werden müssen.

Die erreichte Transformationseffizienz ($1,2 \times 10^6$) im durchgeführten Screen war ausreichend, um statistisch jedes vorhandene Gen in der humanen cDNA-Bank mindestens einmal zu MOCS3 in die Hefezelle transformiert zu haben. Die transformierten Zellen wurden zunächst nur auf SD-Platten ohne Histidin auf die Transkription des HIS3-Gens selektiert, welches das Wachstum auf Histidin-freiem Medium erlaubt, damit auch schwache Interaktionen erfasst werden. Dies führte allerdings auch zu einer hohen Zahl an falsch-positiven Klonen, was durch die Reduzierung der ursprünglichen 400 Klone auf SD-His-Platten auf 38 Klone auf SD-His –Ade + X- α -Gal-Platten deutlich wurde.

Von den identifizierten humanen Proteinen wurde keines mit einer solchen Häufigkeit an unabhängigen Klone gefunden, dass von einer spezifischen Interaktion ausgegangen werden kann. Dennoch kann auch durch das Auftreten eines einzelnen Klones eine *in vivo* Interaktion gegeben sein. Allerdings lässt sich zu keinem der identifizierten Proteine ein offensichtlicher funktioneller Bezug zu MOCS3 herstellen. Die putativen Funktionen von MOCS3, Adenylierung und Sulfurylierung, sind nicht unmittelbar mit den gefundenen Proteinen zu verbinden. Als einziges Protein lässt sich hier Serum Albumin ausnehmen, da für dieses Protein unter anderem eine Funktion im Schwefeltransport der Zelle postuliert wird (Westley & Westley, 1983; Toohey, 1986). Die erhaltenen positiven Klone aus dem Two Hybrid Screen stellen somit einen Pool aus möglichen Interaktionspartnern von MOCS3 dar, auf welche durch weitere Erkenntnisse in der Zukunft eventuell zurückgegriffen werden könnte. Ebenfalls festzuhalten ist, dass in diesem Two Hybrid Screen keine Interaktion mit MOCS2A festgestellt werden konnte. Dies bestätigt die bekannte Tatsache, dass die positive Interaktion in einem Two Hybrid Screen von vielen Faktoren negativ

beeinflusst werden kann und somit auch bekannte Proteininteraktionen in einem Two-Hybrid Screening Ansatz nicht immer bestätigt werden können. Auch für zwei mögliche weitere Funktionen von MOCS3 konnten durch den Two-Hybrid-Screen keine weiteren Anhaltspunkte geliefert werden. Zum einen konnte für die mögliche Funktion von MOCS3 in der Augenlinse (Bharesh *et al.*, 2002) kein weiterer Hinweis gefunden werden, wo MOCS3 als Pax6 reguliertes Protein identifiziert wurde, da es sowohl in Pax6 heterozygoten Linsen bzw. Augen und in Pax6 überexprimierenden Linsen veränderte Transkriptionslevel zeigte. Bei Pax6 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, welcher in der Entwicklung des visuellen und olfaktorischen Systems eine wichtige Rolle spielt. Zum anderen ergab sich durch Homologien von MOCS3 zum Protein Uba4 aus *S. cerevisiae* eine mögliche weitere Funktion. *S. cerevisiae* ist der bis dato einzige bekannte Organismus, welcher nicht über eine Moco-Biosynthese verfügt. Dennoch gibt es ein MOCS3 homologes Protein in dieser Hefe, welches ebenfalls zur Familie der E1-Enzyme zählt. Dieses Uba4 katalysiert analog zu MOCS3 und MOCS2A die Adenylierung eines C-terminalen Doppelglycin-Motivs an Urm1p (Ubiquitin related modifier 1). Urm1p wird analog zu Ubiquitin an verschiedene Zielproteine ligiert und spielt in *S. cerevisiae* eine wichtige Rolle bei der Nährstofferkennung und Zell-Knospung (Goehring *et al.*, 2003a). Ligiert an Ahp1p übt es eine Funktion bei der Antwort auf oxidativen Stress aus (Goehring *et al.*, 2003b). Uba4 verfügt wie MOCS3 über eine C-terminale Rhodanese-ähnliche Domäne welche keine Sulfurtransferase-Funktion sondern eine E2-Enzym analoge Funktion zugeschrieben wird (Hochstrasser, 2000). Das „active-site“ Cystein von Uba4 bildet hierbei einen Thioester mit dem C-terminalen Glycin von Urm1p bevor Urm1p auf das entsprechende Zielprotein übertragen wird. Datenbankanalysen ergaben, dass es im Menschen ein Urm1p homologes Protein gibt jedoch kein Uba4 homologes Protein und es wäre denkbar, dass MOCS3 die Funktion der Aktivierung von Urm1 im Menschen übernehmen könnte. (Abb.3.1).

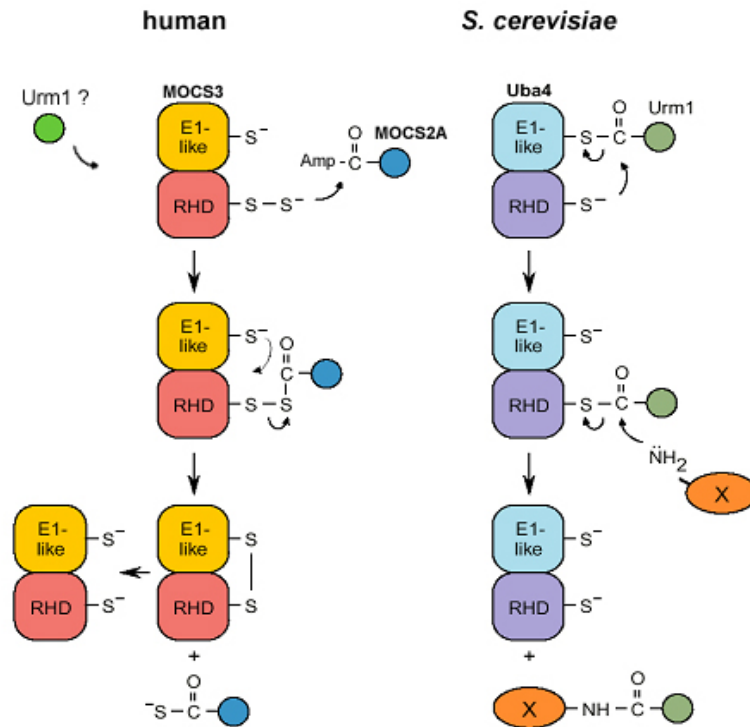


Abb. 3.1: Vergleich der postulierten Funktionen von MOCS3 und Uba4 (verändert nach Hochstrasser, 2000)

Gezeigt ist eine Gegenüberstellung der postulierten Funktionen von MOCS3 bei der Thiocarboxylierung von MOCS2A im Menschen und von Uba4 bei der Konjugation von Urm1p an ein Zielprotein in *S. cerevisiae*. Der Persulfid-Schwefel von MOCS3 bildet mit MOCS2A ein Disulfid-Intermediat aus, bevor das konservierte Cystein der E1-ähnlichen Domäne durch reduktive Spaltung der Disulfid-Bindung für die Freisetzung des thiocarboxylierten MOCS2A sorgt. Im Falle von Uba4 liegt das Cystein der Rhodanese-ähnlichen Domäne nicht in einer persulfurierten Form vor und bindet Urm1p bevor es auf ein Zielprotein (X) übertragen wird.

3.2 Lokalisation von MOCS3, MOCS2A und MOCS2B

Zur Analyse, in welchem Kompartiment die Moco-Biosynthese in Eukaryoten lokalisiert ist und zur Überprüfung, ob eventuell die N-terminale Extension von MOCS3 als zelluläres Signalpeptid zur Lokalisierung in einem bestimmten Zellkompartiment dient, wurden Lokalisierungsexperimente in humanen- und Maus-Zelllinien durchgeführt. Für Co-Lokalisierungsexperimente wurden neben MOCS3 auch MOCS2A und MOCS2B als GFP-Fusionsproteine transient exprimiert. Sowohl die N- und C-terminalen GFP-Fusionsproteine als auch die Flag-getaggte Variante

zeigten eine cytoplasmatische Verteilung von MOCS3 innerhalb der beiden Zelllinien und so bleibt die Funktion der N-terminalen Extension von MOCS3 weiter spekulativ. Neben der cytoplasmatischen Lokalisierung von MOCS2A konnte auch ein weiterer Anteil des Proteins im Kern gefunden werden. Diese nukleare Lokalisation könnte unspezifisch in den Kern erfolgen, da durch die geringe Größe von 36 kDa ein Transport durch die Kernporen auch ohne spezifisches Lokalisierungssignal möglich ist. Allerdings sollte die Möglichkeit eines spezifischen Transportes von MOCS2A in den Kern in Erwägung gezogen werden, da z.B. SUMO, ein Ubiquitin-ähnliches Protein mit einem C-terminalen Doppel-Glycin Motiv, im Kern eine wichtige Rolle bei der Regulation der Aktivität von Transkriptionsfaktoren spielt (Girdwood *et al.*, 2004). Auch kann die Konjugation mit SUMO den Import eines ursprünglich cytoplasmatischen Proteins in den Kern vermitteln (Matunis *et al.*, 1996).

Eine gemeinsame Lokalisierung der drei getesteten Proteine in einem Zellkompartiment ist sinnvoll, da sie alle für die von ihnen katalysierte Reaktion, der Umwandlung von Precursor Z in MPT miteinander interagieren müssen.

Im Menschen wird der Molybdäncofaktor für die Aktivitäten der Enzyme Sulfat-Oxidase (SOX), Xanthin-Dehydrogenase (XDH) und Aldehyd-Oxidase (AO) benötigt. Während die XDH und AO eine cytoplasmatische Lokalisierung zeigen, ist die SOX im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert (Cohen *et al.*, 1972). Ein Einbau des Molybdäncofaktors in das Protein vor dem Import in den Intermembranraum der Mitochondrien erscheint unwahrscheinlich, da Proteine ungefaltet in dieses Zellkompartiment transportiert werden. Wahrscheinlicher wäre der aktive oder passive Transport vom Moco durch die äußere Mitochondrienmembran, doch bisher ist die Antwort auf die Frage, wann der Molybdäncofaktor in die Sulfatoxidase eingebaut wird, offen.

3.3 Heterologe Expression und Aufreinigung von MOCS3

Zur biochemischen Charakterisierung der Funktion von MOCS3 war es nötig, das Protein in einer löslichen Form aufzureinigen. Datenbankanalysen und Aminosäuresequenzvergleiche ergaben, dass MOCS3 im Gegensatz zu dem *E. coli* MoeB Protein aus einer zusätzlichen C-terminalen Domäne und einer N-terminalen Leader-Sequenz von 51 Aminosäuren besteht. Erste Versuche einer heterologen Expression von MOCS3 in *E. coli* in verschiedenen Expressionssystemen führten zu

unlöslichen Protein-Aggregaten (inclusion bodies). Aus diesem Grunde wurden weitere Expressionssysteme getestet, um das Protein in einer löslichen Form reinigen zu können. Zum einen wurde ausprobiert, MOCS3 in einem eukaryotischen Expressions-System zu exprimieren, doch die Expression in *P. pastoris* war nicht erfolgreich. Erst die Hilfenahme von Fusionsproteinen wie Calmodulin, GST und Intein, welche zum einen die Aufreinigung erleichtern, aber auch die Löslichkeit erhöhen können, führte in einem Fall zu löslichen Protein. Durch die Fusion von GST an den N-Terminus von MOCS3 konnte lösliches Protein gewonnen werden, wobei allerdings weiterführende Analysen zeigten, dass dieses lösliche Protein in einer aggregierten Form im Komplex mit *E. coli* GroEL vorlag. Diese Coexpression und Assemblierung mit GroEL zeigt wiederum, dass das Protein nicht vollständig gefaltet ist und hydrophobe Bereiche exponiert sind, welche zu einer Aggregation führen. Um zu untersuchen, ob eine einzelne Domäne für diese Aggregation verantwortlich ist, wurde das Protein ohne N-terminale Leader-Sequenz exprimiert sowie die N-terminale MoeB homologe Domäne als auch die C-terminale Rhodanese-ähnliche Domäne separat exprimiert. Die Ergebnisse für die einzelnen Domänen zeigten dann, dass die Aggregation der MoeB-homologen Domäne wohl für die Unlöslichkeit des Gesamtproteins verantwortlich ist und die separate Rhodanese-ähnliche Domäne sich in *E.coli* exprimieren und in einer löslichen Form aufreinigen lässt. Für die Aufreinigung der MoeB-Domäne von MOCS3 bestehen für die Zukunft noch mehrere Möglichkeiten. Zum einen wurde begonnen verschiedene Cysteinreste zu mutieren, um unspezifische Disulfid-Brücken während der Aufreinigung zu vermeiden. Neben den Zink-kordinierenden Cysteinen und dem hochkonservierten Cystein 239 liegen noch 7 weitere Cysteinreste in der MoeB Domäne von MOCS3 vor welche zu Serinen mutiert werden sollen. Des weiteren soll versucht werden, die N-terminale Leadersequenz auf verschiedene Weise zu verkürzen. Auch dies führte zum Beispiel bei Uba4 aus *S. cerevisiae* (persönliche Mitteilung H. Schindelin) oder auch Nfs1p (Mühlenhoff *et al.*, 2002) zu löslichen Proteinen. Außerdem könnte die Expression in Insektenzellen eine weitere Möglichkeit zur erfolgreichen Expression darstellen, da dieses Expressionssystem dem humanen System sehr nahe kommt.

3.4 Charakterisierung der Rhodanese-ähnlichen Domäne von MOCS3

3.4.1 Thiosulfat:Sulfurtransferase Aktivität von MOCS3-RLD

Nach der erfolgreichen Expression und Aufreinigung von MOCS3-RLD konnte eine Thiosulfat:Sulfurtransferase Aktivität nachgewiesen werden. Somit bestätigte sich die Annahme, dass ein Rhodanese-ähnliches Protein mit einer Konsensus-Sequenz C(R/K)XGX(R/D) im katalytischen Loop Thiosulfat als Schwefelquelle verwenden kann (Bordo & Bork, 2002). Die katalytische Aktivität von MOCS3 war allerdings im Vergleich zu der Rhodanese aus *Bos taurus* ca. um das 10^3 -fache geringer. Für diese deutlich geringere Aktivität bieten sich mehrere Erklärungsmöglichkeiten an. Zum einen könnte MOCS3-RLD in einer nicht optimal gefalteten Konformation vorliegen und daher eine geringere Aktivität mit Thiosulfat und Cyanid aufweisen. Es ist auch möglich, dass die geringere Aktivität am Schwefel-Akzeptor Cyanid liegt oder dass es sich bei Thiosulfat nicht um das physiologische Substrat handelt und der Schwefel entweder von einer anderen niedermolekularen Substanz oder einem weiteren schwefelübertragenden Protein stammt. Für diese Annahme finden sich mehrere Hinweise, wenn man sich den katalytischen 6-Aminosäuren umfassenden Loop von MOCS3-RLD im Detail betrachtet. Von der MOCS3-Sequenz $_{412}\text{CKLGND}_{417}$ sind in allen Thiosulfat-Sulfurtransferasen dieser Familie die Aminosäuren Cystein an Position eins und Glycin an Position vier komplett konserviert (Abb.3.2). Den beiden Aminosäuren an Position zwei und drei wird eine wichtige Rolle bei der Substraterkennung zugeschrieben (Ploegman *et al.*, 1978, 1979). Hierbei fällt auf, dass in bekannten Thiosulfat:Sulfurtransferasen mindestens einer dieser Aminosäurereste positiv geladen ist und in den meisten Fällen beide Aminosäuren eine positive Ladung tragen (z.B. Rhodanese aus *B. taurus*, Arginin und Lysin) (Abb.3.2). In den bisher charakterisierten Mercaptopyruvat:Sulfurtransferasen sind diese Positionen jedoch nicht mit positiv-geladenen Aminosäuren besetzt (z.B. MST aus *R. norvegicus*, Glycin und Serin). Dies könnte direkt mit der Ionenladung der beiden verschiedenen Substrate Thiosulfat (2^-) und Mercaptopyruvat (1^-) zusammenhängen. Mutationsanalysen mit der Rhodanese aus *R. norvegicus* konnten die wichtige Rolle dieser beiden Aminosäuren für die Substratspezifität zeigen (Nagahara *et al.*, 1995). So führte sowohl die Änderung des

katalytischen Loops der Ratten-Leber Rhodanese von CRKGV T zu CGKGV T, als auch zu CRSGV T zu einer geringeren Thiosulfat:Sulfurtransferase Aktivität und einer höheren Mercaptopyruvat:Sulfurtransferase Aktivität. Interessanterweise konnte für MOCS3-RLD vor kurzem eine ähnliche Beobachtung gemacht werden. Hier war es jedoch möglich, durch den Austausch von Leucin414 gegen ein Lysin und somit der Einbringung einer weiteren positiven Ladung, die Thiosulfat:Sulfurtransferase Aktivität von MOCS3-RLD zu steigern (Inga Preuss, persönliche Mitteilung). Dies zeigt, dass Thiosulfat *in vivo* wahrscheinlich nicht das natürliche Substrat ist.

Rhodanese (<i>B. taurus</i>)	C	R	K	G	V	T
Rhodanese (<i>R. norvegicus</i>)	C	R	K	G	V	T
GlpE (<i>E. coli</i>)	C	Y	H	G	N	S
MOCS3 (<i>H. sapiens</i>)	C	K	L	G	N	D
Uba4 (<i>S. cerevisiae</i>)	C	R	Y	G	N	D
MST (<i>R. norvegicus</i>)	C	G	S	G	V	T
MST1 (<i>A. thaliana</i>)	C	G	T	G	V	T
SseA (<i>E. coli</i>)	C	G	S	G	V	T

Abb. 3.2: Vergleich der 6-Aminosäuren umfassenden katalytischen Loops Rhodanese-ähnlicher Proteine aus verschiedenen Organismen

Die hochkonservierten Aminosäurereste Cystein an Position 1 und Glycin an Position 4 sind dunkelgrau hinterlegt. Positive Aminosäurereste sind hellgrau hinterlegt.

Als alternative Schwefelquellen kommen innerhalb des humanen Stoffwechsels verschiedene niedermolekulare Substanzen wie Persulfide, Polysulfide und Polythionate sowie Schwefelübertragende Proteine in Frage (Abb. 3.3). Hierbei ist den meisten möglichen Schwefelquellen und besonders den Protein-gebundenen Schwefeln gemeinsam, dass es sich bei dem zu transferierenden Schwefel um einen sogenannten Sulfan-Schwefel handelt. Ein Sulfan-Schwefel ist labil, sehr reaktiv und liegt in einer reduzierten Oxidationsstufe mit einer Elektronenvalenz von 0 oder –1 vor. Dabei ist er immer an ein anderes Schwefelatom gebunden (Iciek & Wlodek, 2001). Niedermolekulare Substanzen mit einem Sulfan-Schwefel treten hauptsächlich bei der Synthese und beim Abbau der beiden Aminosäuren Cystein und Methionin auf. Als Beispiele lassen sich hierfür, neben Thiosulfat Thiocystein oder das stabilere Thiocystin nennen. Auch Substanzen ohne Sulfan-Schwefel

könnten in Frage kommen, wie zum Beispiel H_2S und Methandiol. Dabei wäre H_2S eher unwahrscheinlich, da es toxisch für die Zelle ist. Proteine als Schwefeldonoren könnten den Schwefel entweder in Form eines Persulfids oder eines Trisulfids zur Verfügung stellen. Beispiele hierfür wären L-Cystein-Desulfurasen, Serum Albumin, Mercaptopyruvat:Sulfurtransferasen oder auch andere Rhodanesen, welche Schwefel in Form eines Persulfides übertragen würden. Als ein Trisulfid-haltiges Protein wäre Cystathionase ein Beispiel.

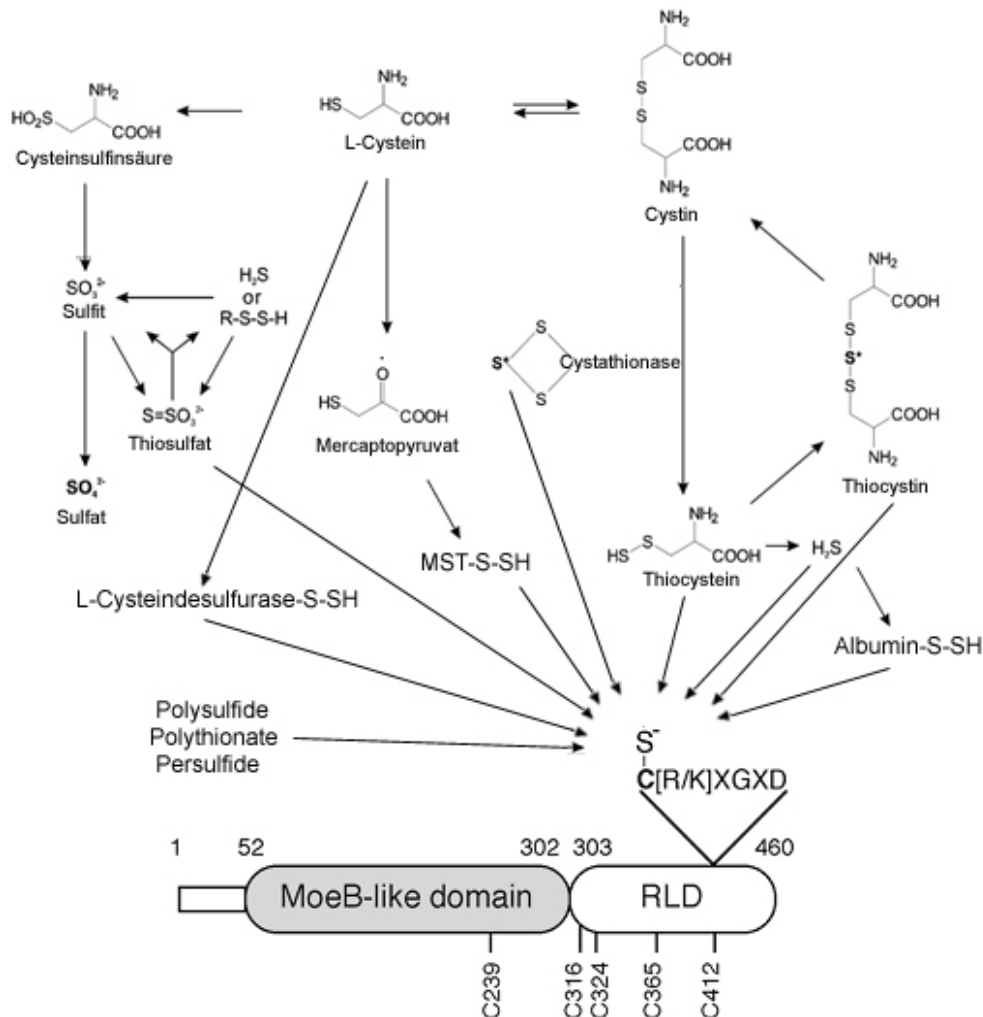


Abb. 3.3: Mögliche Schwefelquellen für die Thiocarboxylierung von MOCS2A durch MOCS3

Die verschiedenen Schwefeldonoren für die Ausbildung einer Persulfid-Gruppe an MOCS3-C412 sind dargestellt. Als Schwefeldonoren könnten sowohl niedermolekulare Substanzen aus dem Stoffwechsel, wie Thiosulfat oder Thiocystin als auch schwefelübertragende Proteine, wie L-Cystein-Desulfurasen oder Mercaptopyruvat-Sulfurtransferasen fungieren.

Allgemein lässt sich festhalten, dass Sulfhydryl-Gruppen durch ihre hohe Reaktivität einer komplexen Regulation in Abhängigkeit der Redox-Eigenschaften des umgebenen Milieus ausgesetzt sind. Als Beispiel wäre hier nur der reversible Prozess der Reaktion von Glutathiondisulfid mit Thiol-Gruppen zu nennen (Collison *et al.*, 1986; Mannervik & Axelsson *et al.*, 1980). Aus diesem Grund sind Vorhersagen über mögliche Schwefelquellen von MOCS3 schwer zu treffen, da über die tatsächliche Verfügbarkeit einzelner Verbindungen sehr wenig bekannt ist.

3.4.2 Humanes Nfs1 als Schwefelquelle?

In der 4-Thiouridin-Synthese konnte gezeigt werden, dass der zu übertragende Schwefel von einer L-Cystein-Desulfurase (IscS) auf die Rhodanese-ähnliche Domäne von ThiI übertragen wird (Kambampati & Lauhon, 1999) (Abb. 3.6). Aufgrund dessen sollte untersucht werden, ob eine Schwefelübertragung durch eine L-Cystein-Desulfurase auch für die Sulfurierung der Rhodanese-ähnlichen Domäne von MOCS3 möglich ist. Seine Hauptfunktion übt IscS (iron sulfur cluster synthesis protein S) in *E. coli* bei der Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese aus. Es fungiert hier als Schwefeldonor mit L-Cystein als Schwefelquelle. In Eukaryoten ist die Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese am besten in *S. cerevisiae* erforscht. Das IscS homologe Protein in der Hefe ist Nfs1p und es konnte gezeigt werden, dass die Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese hier in den Mitochondrien stattfindet (Lill & Kispal, 2000). Für Nfs1p konnte gezeigt werden, dass dieses nicht ausschließlich in den Mitochondrien lokalisiert ist, sondern auch im Cytoplasma und im Kern (Tong, 2003; Lill & Mühlenhoff, 2005). So wurde zum Beispiel eine Beteiligung von Nfs1p bei der Produktion von Thionukleotiden für tRNA im Zellkern beschrieben (Nakai *et al.*, 2004). Die Nutzung alternativer Startcodons zur Generierung einer cytoplasmatischen und nuklearen Form von Nfs1, wie von Land & Rouault (1998) beschrieben, wird als eher unwahrscheinlich betrachtet, da Komplementationsanalysen mit N-terminal verkürzten Nfs1p Konstrukten in Nfs1p-Mutanten (GAL-NFS1) zeigten, dass vor den alternativen Startcodons liegende Aminosäuren essentiell für die Aktivität des Proteins sind (Mühlenhoff *et al.*, 2004). Für das Vorkommen von Nfs1 im Cytoplasma könnte zum Beispiel eine retrograde Translokation des Proteins verantwortlich sein, dass nach Abspalten der mitochondrialen Zielsequenz der Transportmaschinerie entkommt (Ungermann *et al.*,

1994), wie für das Protein Fumarase aus *S. cerevisiae* beschrieben, das eine duale Lokalisation in Mitochondrien und Cytoplasma zeigt (Stein *et al.*, 1994).

Analog zu dem Hefeprotein war es auch für das humane Nfs1 nicht möglich, das Protein mit kompletten N-terminalen Leader in einer löslichen Form zu reinigen. Die Komplementation der Hefe-Mutante GAL-NFS1 zeigt die Funktionalität des humanen Nfs1-Proteins, in dem die 35 N-terminalen Aminosäuren gegen das mitochondriale Leaderpeptid der F₁β-Untereinheit aus *Neurospora crassa* ausgetauscht sind. Hingegen zeigt das gereinigte Nfs1-Protein als N-terminale His₆-Fusion keine Aktivität. Das Spektrum des aufgereinigten Nfs1Δ1-35 zeigte weiterhin, dass das Protein mit PLP gesättigt ist und dies nicht der Grund für die fehlende Aktivität des gereinigten Proteins ist. Photometrisch konnte die Reduktion des gebundenen PLP's mit Cystein verfolgt werden, so dass der Grund für die fehlende Aktivität nicht geklärt werden konnte. Da Nfs1 nicht in aktiver Form gereinigt werden konnte, konnten keine Untersuchungen zum Transfer des Persulfid-Schwefels auf MOCS3 durchgeführt werden.

3.4.3 Der Schwefeltransfer Mechanismus von MOCS3-RLD

Der Mechanismus der Schwefeltransfer-Reaktion einer Rhodanese führt über ein stabiles Zwischenprodukt, wobei der zu übertragende Sulfan-Schwefel als Persulfid am aktiven Cystein-Rest gebunden ist. Bei diesem Cystein-Rest handelt es sich um die erste Aminosäure eines 6-Aminosäure-umfassenden Loops, welcher eine katalytische Tasche ausbildet. Die Mutation jedes einzelnen Cystein-Restes innerhalb der Rhodanese-Domäne von MOCS3 zeigte, dass nur dieses hoch-konservierte Cystein 412 für die Schwefelübertragung von Thiosulfat auf Cyanid essentiell ist. Die Mutationen der anderen drei Cystein-Reste 316, 324 und 365 zeigten keinen Einfluss auf die Sulfurtransferase-Aktivität von Thiosulfat auf Cyanid. Durch den Nachweis des gebildeten Sulfits aus Thiosulfat mit Hilfe der Sulfid-Oxidase konnte gezeigt werden, dass unabhängig von der Übertragung des Schwefels auf einen Akzeptor Sulfid freigesetzt wird und bestätigt somit für MOCS3-RLD die Bildung eines stabilen persulfurierten Zwischenproduktes.

3.4.4 Direkter Nachweis des Persulfids durch ESI-MS/MS

Zur detaillierten Charakterisierung von MOCS3-RLD wurde die Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI-MS) eingesetzt, wodurch genaue Analysen der Masse von Proteinen ermöglicht wurden. Durch tryptischen Verdau der Proteine und die weiterführende Analyse der entstandenen Proteinfragmente durch ESI-MS/MS konnten Abweichungen von der kalkulierten Masse festgestellt werden und so Modifikationen den jeweiligen Fragmenten und sogar einzelnen Aminosäuren zugeordnet werden.

Durch die massenspektroskopischen Untersuchungen konnten Modifikationen des N-Terminus identifiziert werden wohingegen gezeigt werden konnte, dass der C-Terminus des Proteins unmodifiziert vorlag. Während der heterologen Expression des N-terminalen His₆-MOCS3-RLD Fusionsproteins in *E. coli* wurde das N-terminale Methionin abgespalten. Außerdem konnte eine partielle (10-50 %) α -N-6-Glukonoylierung des N-terminalen Glycin-Restes gezeigt werden. Geoghegan *et al.*, (1999) beschreiben, dass es zu dieser Modifikation speziell zu kommen scheint, wenn ein N-terminaler His₆-Tag durch die Klonierung in den pET15b-Vektor von Novagen an das zu expremierende Protein fusioniert wurde. Der postulierte Mechanismus für diese 178 Da Modifikation beginnt bei Glukose-6-Phosphat und führt über eine Phospho-Form der Modifikation zur entgültigen N-glukonyl-Gruppe, nachdem die Phospho-Gruppe von einer zelleigenen Phosphatase abgespalten wird (Abb. 3.4).

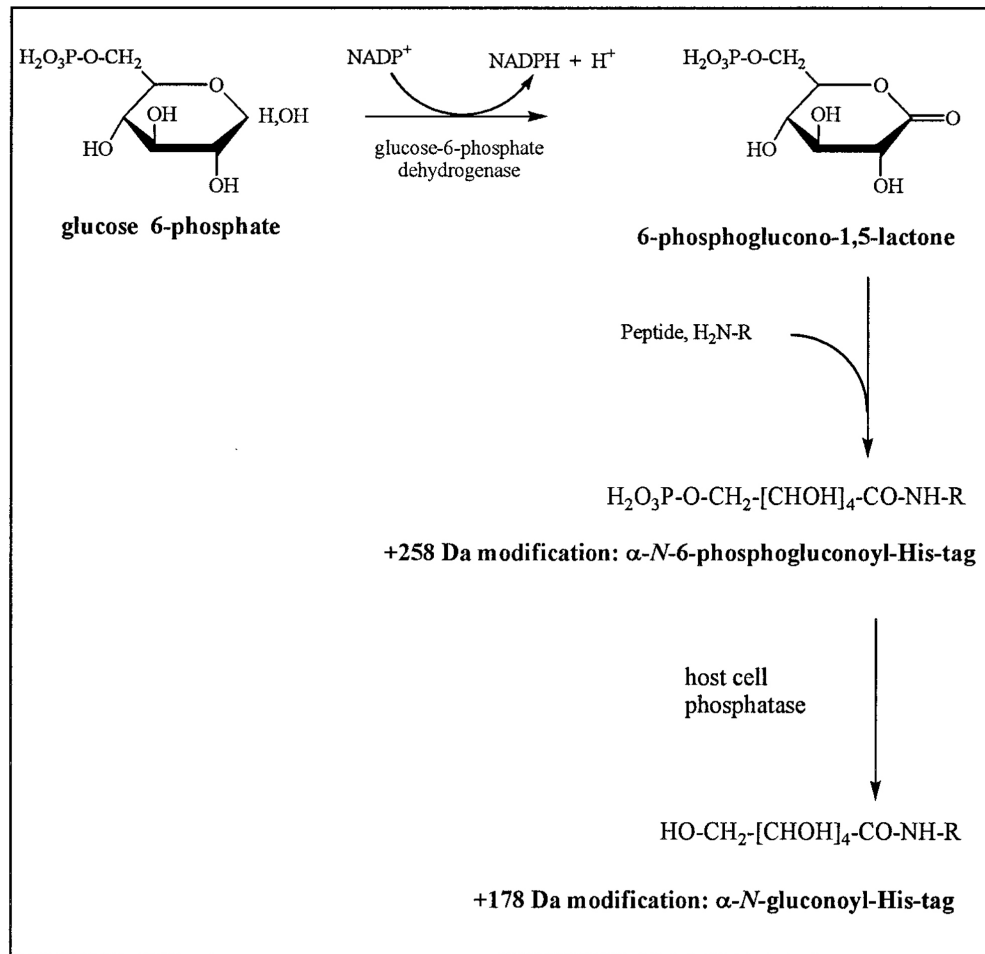


Abb. 3.4: Modell zur N-terminalen Glukonoylierung nach Geoghegan *et al.* (1999)

Das Modell zum Mechanismus der N-terminalen Glukonoylierung geht von Glukose-6-Phosphat aus und führt zu einer 258 Da Modifikation des N-terminalen His₆-Tags wobei die Modifikation in einer phosphorylierten Form vorliegt. Nach Abspalten der Phosphat-Gruppe durch eine Phosphatase entsteht der α -N-glukonoylierte-His₆-Tag mit einer Masse von + 178 Da.

Aktivitätsvergleiche zwischen MOCS3-RLD mit His₆-Tag und nach Abspaltung der His₆-Fusion mit Thrombin zeigten keinen Einfluss der Glukonoylierung auf die Sulfurtransferase-Aktivität. Dennoch ist die Entdeckung dieser partiellen Protein-Modifikation von Interesse für weitere Applikationen, da sie zu einer Heterogenität des Proteingemisches führt. Besonders für die erfolgreiche Protein-Kristallisation ist eine homogene Proteinlösung eine wichtige Voraussetzung und es konnte bereits für die SH3 Domäne der Hühnchen Tyrosinkinase gezeigt werden, dass die, durch die Glukonoylierung herbeigeführte Heterogenität eine Proteinkristallisation verhinderte. Erst nach Abspalten der N-terminalen His₆-Fusion gelang es

Proteinkristalle zu erhalten (Kim *et al.*, 2001). Auch mit MOCS3-RLD wurden im Rahmen dieser Arbeit erste Versuche zur Kristallisation mit dem His₆-getaggten Protein durchgeführt, welche aber bisher erfolglos blieben. Aus diesem Grund wird für zukünftige Kristallisationsansätze das Protein nach Abspaltung des His₆-Tags mit Thrombin eingesetzt werden, um Heterogenität zu vermeiden.

Durch gerichtete Mutagenese wurden die Cystein-Reste von MOCS3-RLD gegen Alanin ausgetauscht und es konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden, dass Cystein 412 im Gegensatz zu den Cysteinen 316, 324 und 365 für die Aktivität des Proteins essentiell ist. Ein direkter Nachweis des Persulfids an MOCS3-C412 gelang durch die ESI-MS/MS Analysen, wobei gezeigt werden konnte, dass der Persulfid-Schwefel am Fragment ₃₉₈QGTQEGAAVPIYVICK₄₁₃ gebunden ist. Bei den ersten Versuchen zum direkten Nachweis des Persulfid-Schwefels kam es zu Oxidationen der Cystein-Reste und somit zusätzlichen Massen, welche die Identifizierung einer Sulfurierung erschwerten. Die Probleme mit diesen Oxidationen der einzelnen Cysteine während der massenspektroskopischen Analysen konnten durch die Alkylierung mit Iodoacetamid gelöst werden. Hierbei konnten die beiden carboxyamidomethylierten Formen des Zielpeptids ₃₉₈QGTQEGAAVPIYVICK₄₁₃ mit einer Massendifferenz von 32 Da zwischen Thiosulfat- und Cyanid-vorbehandelten MOCS3-RLD identifiziert werden. Analysen der restlichen Peptide ergaben, dass keines von ihnen in einer persulfurierten Form vorlag.

Sowohl die Ergebnisse aus der Detektion freier Thiol-Gruppen mit DTNB als auch die massenspektroskopischen Analysen zeigten eindeutig die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen Cystein 316 und Cystein 324. Für C365 konnte gezeigt werden, dass die Sulfhydryl-Gruppe auf der Oberfläche des Proteins exponiert vorliegt, da sie sowohl mit DTNB als auch mit Iodoacetamid zu markieren war. Die Aktivitätsmessungen mit der MOCS3-RLD-C316A/C324A Variante zeigten, dass C316 und C324 nicht am Schwefeltransfer-Mechanismus beteiligt sind. Beide Cysteine sind in der Linker-Region von MOCS3 zwischen MoeB-Domäne und Rhodanese-Domäne lokalisiert und die Ausbildung einer Disulfidbrücke könnte eine Rolle bei der Positionierung der beiden Proteindomänen während des Schwefeltransfers auf MOCS2A haben. Die Ausbildung von Disulfidbrücken wurde auch schon bei der Rhodanese aus *Bos taurus* beobachtet und gibt Anlass zur Spekulation über eine mögliche Funktion (Weng *et al.*, 1978). Auch bei dieser Rhodanese liegen insgesamt vier weitere Cystein-Reste vor, welche scheinbar

wichtige strukturelle und funktionelle Aufgaben im Protein haben. Beispiele für solche Aufgaben liegen unter anderem in der Protein-Faltung und in der Reaktivierung nach oxidativer Inaktivierung (Miller-Martini *et al.*, 1994; Kaur *et al.*, 2004).

3.5 Thiocarboxylierung von MOCS2A durch MOCS3

Die lösliche Fraktion der Aufreinigung des N-terminalen GST-MOCS3 Fusionsproteins zeigte Thiosulfat:Sulfurtransferase Aktivität, doch konnte bei dem Versuch, mit gereinigten Proteinen MPT aus Precursor Z zu bilden gezeigt werden, dass die MoeB-Domäne nicht in der Lage war, MOCS2A zu adenylieren und somit in einer inaktiven Form vorlag. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass *E. coli* MoeB in der Lage ist, MOCS2A zu adenylieren und so konnte für die Untersuchungen der Sulfurtransferase Aktivität von MOCS3 die separate Rhodanese-ähnliche Domäne eingesetzt werden. Das *in vitro* System bestand demnach aus MOCS2A-OH, MOCS2B, Mg-ATP, MoeB, Precursor Z und MOCS3-RLD in schwefelbeladener Form oder mit Thiosulfat als Schwefelquelle. Da in diesem Ansatz MPT produziert werden konnte, zeigte dies die Funktion von MOCS3-RLD als direkter Schwefeldonor für die Thiocarboxylierung von MOCS2A. Dies war der Beweis dafür, dass MOCS2A vermutlich der physiologische Schwefelakzeptor von MOCS3 ist.

Dass MOCS3 in der Lage ist, MOCS2A zu adenylieren, konnte *in vivo* durch die Komplementation einer *E. coli moeB*-Mutante mit MOCS2A, MOCS2B und MOCS3 nachgewiesen werden. MOCS3 alleine war jedoch nicht in der Lage, eine *E. coli moeB*-Mutante zu komplementieren. Erst die Coexpression mit MOCS2A und MOCS2B konnte die Aktivität der Nitratreduktase zu 28 % im Vergleich zum *E. coli* MoeB wiederherstellen. Die gleiche Beobachtung wurde bereits bei der Komplementation einer *E. coli moaD*-Mutante gemacht, wobei MOCS2A und MOCS2B ohne MOCS3 nicht in der Lage waren, die Nitratreduktase Aktivität wiederherzustellen (Leimkühler *et al.*, 2003). Da gezeigt werden konnte, dass MoeB zumindest *in vitro* in der Lage ist MOCS2A zu adenylieren scheint die essentielle Funktion von MOCS3 bei dieser Komplementation in der Sulfurierung von MOCS2A zu liegen und deutet auf unterschiedliche Schwefelquellen im Humanen gegenüber *E. coli* hin. Kombiniert man die Ergebnisse beider Komplementationsansätze mit *moaD* und *moeB* Mutante, so wird deutlich, dass zumindest geringfügige Unterschiede zwischen *E. coli* und humanen System im Mechanismus der Aktivierung der MPT-Synthase vorliegen müssen.

Die einzige Möglichkeit einer Untersuchung der MoeB-homologen Domäne von MOCS3 bot somit die Komplementation einer *E. coli moeB*-Mutante. Hierbei konnte die Auswirkung einer Mutation in MOCS3 auch in der MoeB-homologen Domäne analysiert werden. Durch Messung der Nitratreduktase-Aktivität konnten auch Aussagen über die Quantität der Auswirkung durch eine Mutation gemacht werden. Hierbei stand besonders die Funktion des Cysteins 239 im Vordergrund, da eine Beteiligung dieser Aminosäure am Mechanismus der Thiocarboxylierung von MOCS2A zu vermuten war. Cystein 239 ist in allen bisher untersuchten MOCS3 homologen Proteinen konserviert und entspricht dem aktiven Cystein der Enzyme der E1-Familie. Am Beispiel von Uba1, welches Ubiquitin durch Adenylierung und anschließender Ausbildung einer Thioester-Bindung für die Konjugation an ein Zielprotein aktiviert, konnte gezeigt werden, dass dieser Thioester zwischen dem zuvor aktivierten C-terminalen Glycin von Ubiquitin und dem besagten konservierten aktiven Cystein ausgebildet wird. In jüngster Zeit wurden immer mehr Proteine beschrieben, bei welchen eine solche Proteinaktivierung wie beim Ubiquitin beschrieben werden konnte. Dazu gehören RUB1, SUMO, APG12, Urm1 und auch ThiS (Parry & Estelle, 2004; Domen J., 2004; Mizushima *et al.*, 1998; Furukawa *et al.*, 2000; Hochstrasser, 2000; Huang *et al.*, 2004) (Abb. 3.5).

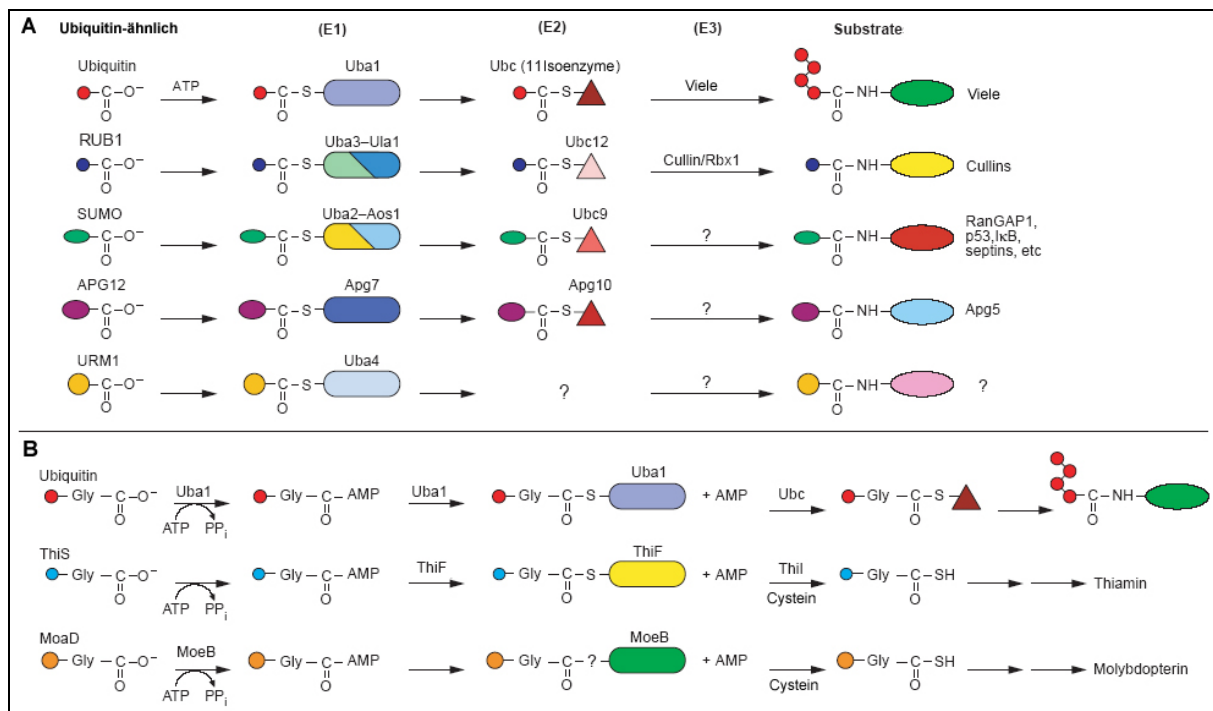


Abb. 3.5: Die Familie der Ubiquitin-ähnlichen Proteine (verändert nach Hochstrasser, 2000)

(A) Dargestellt sind verschiedene Mitglieder der Ubiquitin-ähnlichen Proteine, welche nach Aktivierung mit ihren Zielproteinen ligiert werden. Allen Ubiquitin-ähnlichen Proteinen ist das C-terminale Doppel-Glycin-Motiv gemeinsam, an welchem die Aktivierung durch das entsprechende E1-Enzym erfolgt.

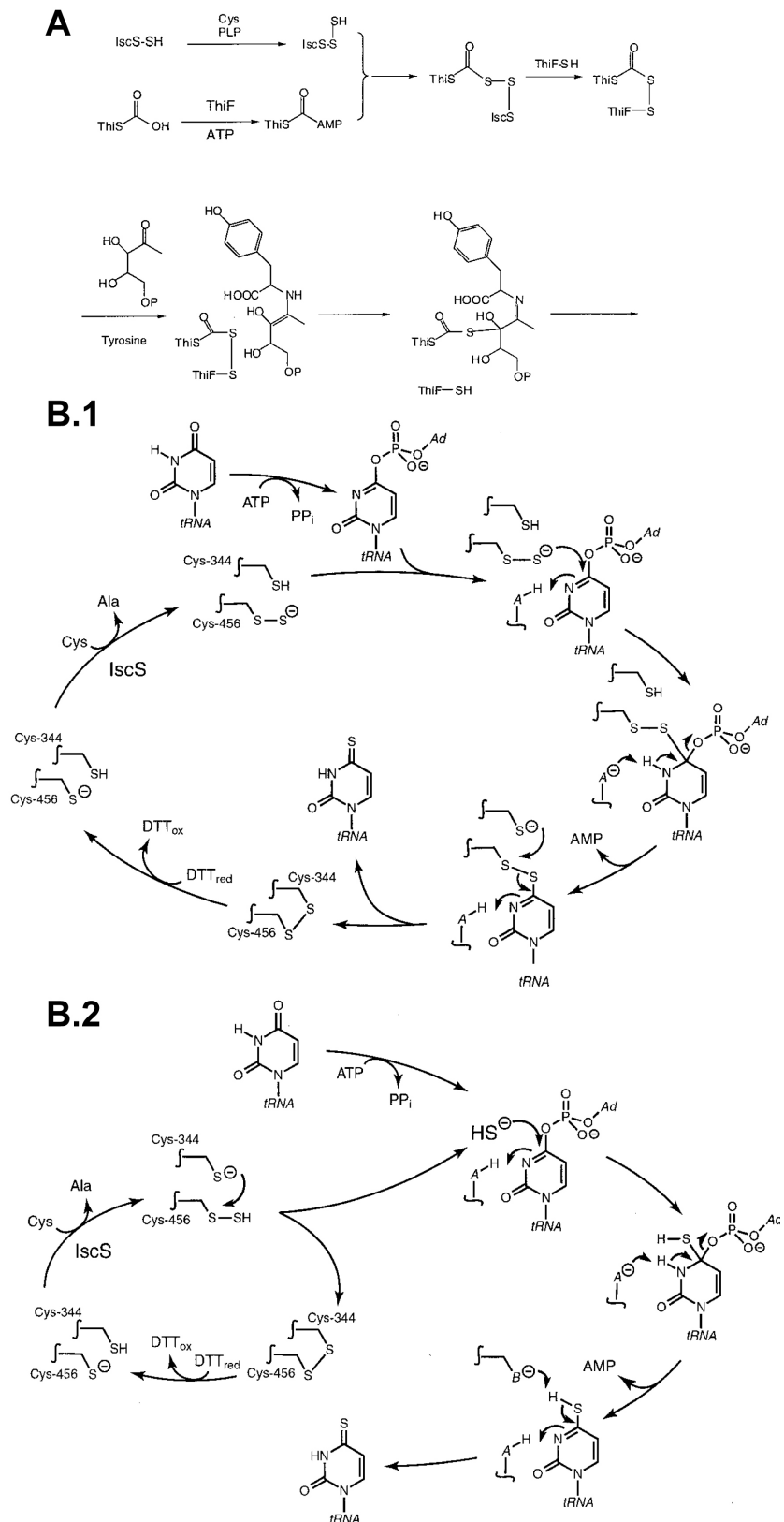
(B) Gezeigt ist ein Vergleich zwischen der Ubiquitin-Aktivierung bzw. -Konjugation und den Biosynthese-Wegen für Thiamin und Molybdopterin. Wieder kommt es zur Aktivierung durch Adenylierung am Doppel-Glycin-Motiv, jedoch wird im Falle der Biosynthese von Molybdopterin kein Thioester am konservierten Cystein-Rest ausgebildet.

Auch die Proteine der Moco-Biosynthese MoaD (Ubiquitin-ähnlich) und MoeB (Uba1-ähnlich) gehören zu der Familie der Ubiquitin-ähnlichen und Ubiquitin-aktivierenden (E1) Enzyme, jedoch konnte gezeigt werden, dass es nicht zu der Ausbildung eines Thioesters zwischen MoeB C187 und MoaD kommt und die Gemeinsamkeiten der Funktion von MoeB mit Uba1 (E1) auf die Ausbildung des Acyl-Adenylats am jeweiligen Zielprotein beschränkt ist (Leimkühler *et al.*, 2001; Lake *et al.*, 2001). Auch ergaben *in vitro* Mutationsanalysen von MoeB, dass dieses Cystein187 für die Gesamtreaktion in *E. coli* nicht essentiell zu sein scheint (Leimkühler *et al.*, 2001).

Die Ergebnisse aus der *moeB*-Mutanten-Komplementation mit MoeB C187A und MOCS3 C239A zeigten allerdings erhebliche Unterschiede in der Auswirkung der beiden Mutationen. War in der Komplementation mit MOCS3 C239A die Nitratreduktase-Aktivität immerhin um 81 % gegenüber dem Wildtyp MOCS3 reduziert, so konnte bei MoeB C187A nur ein geringfügiger Abfall der Nitratreduktase-Aktivität beobachtet werden. Die geringe Auswirkung der MoeB C187A Mutation korrespondiert hier mit den bereits zuvor genannten Ergebnissen (Leimkühler *et al.*, 2001). Die wichtige Funktion von MOCS3 C239 für die Thiocarboxylierung von MOCS2A im Gegensatz zur Funktion von C187 in MoeB könnte mit dem unterschiedlichen Schwefeltransfer erklärt werden. Ist in *E. coli* vermutlich eine separate L-Cystein-Desulfurase für die Schwefelübertragung auf MoaD verantwortlich (Leimkühler & Rajagopalan, 2001) so wird diese Funktion im humanen System von der Rhodanese-ähnlichen Domäne von MOCS3 ausgeübt. Für die Funktion von C239 in MOCS3 gibt es zunächst zwei Möglichkeiten, die sich aus der Analogie zu den verwandten Biosynthesen von Thiamin und 4-Thiouridin ergeben (Abb.3.6). Analog zur Thiamin-Biosynthese (Abb. 3.6A) könnte C239 eine Disulfid-Bindung mit dem C-Terminus von MOCS2A ausbilden. Dieser Mechanismus wäre für MOCS3 eher unwahrscheinlich. Erstens wurde solch ein Mechanismus für *E. coli* MoeB weitestgehend ausgeschlossen (Leimkühler *et al.*, 2001) und zweitens erfolgt die Schwefelübertragung von MOCS2A auf Precursor Z nicht im Komplex mit MOCS3 sondern im Komplex mit MOCS2B und MOCS2A-SH ist hierbei ein stabiles Zwischenprodukt. Außerdem müsste in diesem Fall die Mutation von C239 zu einem Alanin zum Ausfall der kompletten Proteinaktivität und nicht nur zu einer Reduzierung führen.

Abb. 3.6: Ausschnitt aus den Modellen der Biosynthese von (A) Thiamin (nach Xi *et al.*, 2001) und (B) 4-Thiouridin (nach Mueller *et al.*, 2001)

(A) ThiS wird nach Adenylierung durch ThiF von IscS sulfuriert und die entstandene Disulfidbrücke durch ThiF-C184 gespalten wodurch eine neue Disulfidbrücke zwischen ThiS und ThiF entsteht. Das Substrat greift an der Disulfidgruppe an und wird sulfuriert. (B) Cystein-456 der rhodanese-ähnlichen Domäne von ThiI wird von IscS sulfuriert und bindet (B.1) an die aktivierte Uridin-Form unter Ausbildung eines Disulfid-Intermediats, welches durch C-344 reduktiv gespalten wird, wobei 4-Thiouridin frei wird. In B.2 erfolgt die reduktive Spaltung vor der Ausbildung eines Disulfid-Intermediats wobei Sulfid freigesetzt wird und direkt die aktivierte Uridin-Form sulfuriert.



Wahrscheinlicher erscheint für das C239 eine analoge Rolle zum C344 von Thil während der 4-Thiouridin Biosynthese (Abb. 3.6B1+2). Hierbei kommt diesem Cysteinrest die Funktion der reduktiven Spaltung der S-S-Bindung am persulfurierten C412 bzw. 456 zu. Mueller *et al.*, (2001) postulierten für die Biosynthese von Thiouridin einen Mechanismus, in welchem während der Schwefelübertragung von Thil auf die aktivierte Uridin-Form Sulfid produziert wird (Abb. 3.6 B.2). Dies würde im Falle von MOCS3 bedeuten, dass kein Intermediat aus MOCS3 und MOCS2A ausgebildet wird, sondern das freigesetzte Sulfid das aktivierte MOCS2A sulfuriert. Sowohl für die Thiocarboxylierung von MoaD im *E. coli* System (Leimkühler *et al.*, 2001) als auch für die Sulfurierung von adenyliertem MOCS2A in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Sulfid hierzu in der Lage ist. Somit ist diese Form des Schwefeltransfer-Mechanismus für die Moco-Biosynthese nicht auszuschließen aber aufgrund der Toxizität von Sulfid für die Zelle eher unwahrscheinlich. Vergleiche zwischen Schwefel-beladenem MOCS3-RLD (MOCS3-RLD-SH) und Sulfid bei der Sulfurierung von adenyliertem MOCS2A im Zuge der Bildung von MPT aus Precursor Z zeigten weiterhin, dass Sulfid in einer deutlich höheren Konzentration als MOCS3-RLD-SH eingesetzt werden muss. Dies widerlegt nicht diesen postulierten Mechanismus zeigt aber zumindest, dass die postulierte Freisetzung von Sulfid in räumlicher Nähe zum adenylierten C-Terminus von MOCS2A stattfinden müsste.

Wahrscheinlicher ist demnach ein Mechanismus bei dem kein Sulfid freigesetzt wird und die MOCS3 katalysierte Thiocarboxylierung von MOCS2A könnte nach dem in Abb. 3.7 gezeigten Schema ablaufen. Nach der Adenylierung von MOCS2A durch die MOCS3-MoeB-Domäne würde die Rhodanese-ähnliche Domäne von MOCS3 den Schwefel des persulfurierten C412 auf das aktivierte MOCS2A übertragen und hierbei eine vorübergehende Disulfidverbindung zwischen MOCS3 und MOCS2A erzeugen. Danach würde eine reduktive Spaltung dieser Bindung durch die Thiol-Gruppe von C239 erfolgen, wobei MOCS2A-SH freigesetzt würde und eine vorübergehende Disulfid-Brücke zwischen C239 und C412 ausgebildet würde.

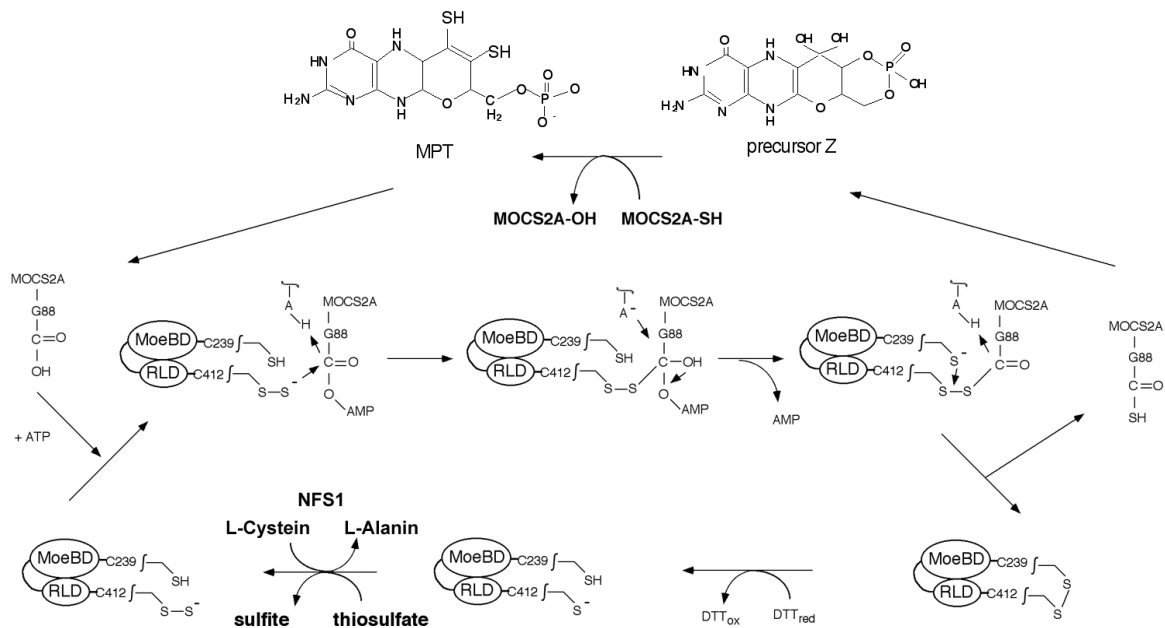


Abb. 3.7: Modell zur Thiocarboxylierung von MOCS2A durch MOCS3

Der Mechanismus postuliert, dass die Persulfid-Gruppe an MOCS3-RLD-C412 als Nucleophil am aktivierten MOCS2A-Adenylat fungiert und sich ein Disulfid-Intermediat ausbildet. Die Spaltung dieser Disulfid-Bindung erfolgt durch den Angriff der Thiol-Gruppe von MOCS3-C239 und thiocarboxyliertes MOCS2A wird freigesetzt. Die Disulfid-Bindung zwischen MOCS3-C239 und MOCS3-C412 könnte *in vivo* durch ein Thioredoxin-System reduziert werden (*in vitro* Reduktion durch DTT ist dargestellt) und MOCS3 wäre für eine erneute Sulfurierung mit Thiosulfat oder einem anderen Schwefeldonor verfügbar.

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Verwendete Medien, Puffer und Lösungen

Standard-Lösungen, Puffer und Medien wurden nach Sambrook *et al.* (1989) mit deionisiertem Wasser hergestellt. Der pH-Wert der Lösungen wurde, wenn nicht anders angegeben, mit HCl oder NaOH eingestellt. Medien, Medienstammlösungen und –Zusätze wurden durch Autoklavieren (20 min, 1 bar, 121°C) oder Sterilfiltrieren (0,2 µm) sterilisiert.

4.1.2 Verwendete Chemikalien und Enzyme

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Fluka, Riedel de Häen, Merck, Sigma, Serva, Roth und BIO-Rad bezogen. Restriktionsendonukleasen sowie DNA- oder Protein-modifizierende Enzyme stammten von den Firmen Stratagene, Promega, Gibco/BRL Life Technologies, MBI Fermentas und New England Biolabs.

4.1.3 Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Referenz	Verwendung
pBS SK II+	Short <i>et al.</i> , 1988	Klonierung
PGEM-T-Easy	Promega	Klonierung
PGEX-6P-1	Amersham Pharmacia	Expression (GST-Fusion)
pET15b	Novagen	Expression (N-terminaler His-Tag)
PTYB2	Chong <i>et al.</i> , 1997	Expression (Intein-Fusion)
pQE80	Quiagen	Expression (N-terminaler His-Tag)
pEGFP-N2	Clontech	Lokalisierung (GFP-Fusion)
pEGFP-C2	Clontech	Lokalisierung (GFP-Fusion)
pcDNA3	Invitrogen	Lokalisierung (Flag-Tag)
pGBKT7	Bartel <i>et al.</i> , 1996	Two-Hybrid Screen
pPICZA	Invitrogen	Expression in <i>P. pastoris</i>
pCal-n	Stratagene	Expression (Fusion mit Calmodulin-bindendem Peptid)
pTrcHis	Temple <i>et al.</i> , 2000	Expression (His-Tag)

Diese Plasmide bildeten die Grundlage für alle in dieser Arbeit benutzten und angefertigten Plasmid-Konstrukte (siehe jeweiliges Kapitel und Anhang)

4.1.4 Bakterien- und Hefestämme

Stamm	Genotyp	Referenz	Verwendung
<i>E. coli</i>			
DH5 α	<i>F</i> , <i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> , (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15), <i>hsdR17</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> <i>relA1</i> , <i>recA56</i>	Hanahan, 1983	Klonierung
BL21 (DE3)	<i>F</i> , <i>ompT</i> , <i>r_B⁻m_B⁻hsdS</i> , <i>gal</i> (λ clts857, <i>ind1</i> , <i>San7</i> , <i>nin5</i> , <i>lac UV5-T7 gene 1</i>)	Studier & Moffatt, 1986	Expression pET und pQE-Vektoren
ER2566	<i>F</i> - λ - <i>fhuA2</i> \square lon \square ompT <i>lacZ</i> :: T7 <i>gene1 gal</i> <i>sulA11</i> Δ (<i>mcrC-mrr</i>) 114:: IS10 R (<i>mcr-73::miniTn10</i>) 2 R(<i>zgb-210::Tn10</i>) 1 (<i>TetS</i>) <i>endA1</i> \square <i>dcm</i> \square	Jack, W., et al. & Chong, S., et al. (1997)	Expression pTYB-Vektoren
<i>moaD</i> ⁻ (DE3)	MJ431 (MJ7 (<i>F</i> ⁻ <i>rpsL</i>) <i>chlM</i> (25) (DE3)	Leimkühler et al., 2001	Mutantenkomplementation, <i>moeB</i> ⁻
<i>moeB</i> ⁻ (DE3)	MJ421 (MJ7 (<i>F</i> ⁻ <i>rpsL</i>) <i>chlN</i> (25) (DE3)	Leimkühler & Rajagopalan, 2001	Mutantenkomplementation, <i>moaD</i> ⁻
<i>S. cerevisiae</i>			
AH109	<i>MATa</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>ade2-101</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3, 112</i> , <i>gal4Δ</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>LYS2::GAL1_{uas}-GAL1_{TATA}</i> ⁻ <i>HIS3</i> , <i>GAL2_{uas}-GAL2_{TATA}</i> ⁻ <i>ADE2</i> , <i>URA3::MEL1_{uas}</i> ⁻ <i>MEL1_{TATA}-lacZ</i>	James et al., 1996	Two-Hybrid Screen
GAL-NFS1	<i>MATa</i> , <i>ura3-1</i> , <i>ade2-1</i> , <i>trp1-1</i> , <i>his3-11, 15</i> , <i>leu2-3112</i> , <i>GAL1-10 promoter region of vector pTL26 in -250- -24 of Nfs1-promotor</i>	Mühlenhoff et al., 2003	Mutantenkomplementation, NFS1p ⁻
<i>P. pastoris</i>			
KM71	<i>arg4 his4 aox1::ARG4</i>	Invitrogen	Expression pPICZ-Vektoren

4.2 Molekularbiologische Arbeiten

4.2.1 Klonierungstechniken

Die Arbeit mit rekombinanter DNA auf Plasmidebene umfasst jegliche Neukombination von DNA und dient der Klonierung von PCR-Fragmenten und der Expression von Genen in verschiedenen Organismen.

Der Einsatz sämtlicher DNA-modifizierenden Enzyme, wie Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase und alkalische Phosphatase, erfolgte entsprechend den Angaben der Hersteller oder nach Sambrook *et al.* (1989). Die Transformation von Plasmid-DNA und Ligationsansätzen in *E. coli* sowie die Herstellung kompetenter *E. coli* DH5 α -Zellen erfolgte ebenfalls nach Sambrook *et al.* (1989). Plasmid-DNA Minipräparationen wurden, je nach späterer Verwendung, entweder mit Hilfe der CTAB-Methode nach Del Sal (1989), durch den Qia-prep Mini-Kit, Qiagen oder mit Hilfe des NucleoSpin® Plasmid-Kits von Macherey & Nagel durchgeführt. Die Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen erfolgte ebenfalls nach Sambrook *et al.* (1989), DNA aus Agarosegelen wurde den Angaben der Hersteller entsprechend mit dem Easy-Pure™ Kit von Biozym oder dem NucleoSpin® Extract-Kit von Macherey & Nagel aufgereinigt.

4.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Aufgrund unterschiedlicher Anforderungen waren teilweise Abwandlungen vom Standardprotokoll nach Sambrook *et al.* (1989) und der Einsatz verschiedener DNA-Polymerasen nötig. Für die Erstellung von Expressiononstrukten wurde die Pwo-DNA-Polymerase eingesetzt (Hybaid; Peqlab). Für einfache Nachweis-Reaktionen konnte eine Taq-Polymerase eingesetzt werden (Promega; AGS-Gold, Hybaid). Für alle PCR Experimente wurden die Thermocycler-Geräte Gen Amp PCR-System 2400 (Perkin-Elmer) bzw. PCR-Express Gradient (Hybaid) eingesetzt.

4.2.3 PCR-Mutagenese

Um gerichtete Mutationen in die Sequenz von MOCS3 einzuführen und für die Erzeugung aller Expressionskonstrukte war es notwendig, an definierten Positionen Mutationen bzw. neue Restriktionsstellen in die cDNA einzuführen. Hierzu wurden

PCR-Amplifikationen mit mutagenisierenden Primern durchgeführt. In einem Volumen von 50 µl erfolgte die PCR-Reaktion in Gegenwart von 1 µM jedes Primers, 200 mM jedes Nukleotides, 20-50 ng Template-DNA und 2,5 U Pwo-DNA-Polymerase. Die Amplifikation erfolgte in 25-30 Zyklen, wobei einzelne Parameter wie Zyklenzahl, Annealingtemperatur und -dauer sowie Elongationszeit den jeweiligen Bedingungen angepaßt wurden. Das Standard-Protokoll für die Mutagenese von MOCS3-RLD setzte sich folgendermaßen zusammen: einmalige Denaturierung bei 94°C für 5 min; 25-30 Zyklen aus Denaturierung bei 94°C für 30 s, Annealing bei 55°C für 30 s und Elongation bei 72°C für 90 s, abschließende Endsynthese bei 72°C für 10 min.

Für Mutagenesen von DNA-Abschnitten in größerer Entfernung zum 3'- und 5'-Ende der Gene wurde die Mutagenese in zwei Schritten durchgeführt. Hierbei kamen zwei verschiedene Strategien zum Einsatz. Zum einen wurde durch eine PCR-Reaktion mit 5'- bzw. 3'-mutagenisierendem Primer und dem jeweils entgegengesetztem 5'- bzw. 3'-Klonierungs-Primer ein PCR-Fragment mit Mutation erzeugt, welches in einer zweiten PCR als zweiter Primer zu dem jeweiligen 5'- bzw. 3'-Klonierungs-Primer eingesetzt wurde. Zum anderen wurden mit zwei komplementären Mutagenese-Primern und ihren jeweiligen entgegengesetzten Klonierungs-Primern zwei PCR-Reaktionen durchgeführt und die beiden resultierenden Fragmente in einer Fusions-PCR fusioniert und zur Klonierung amplifiziert.

4.2.4 DNA-Sequenzierung

Für die DNA-Sequenzierung wurde hochreine über DNA-Isolationskits isolierte Plasmid-DNA (NucleoSpin Plasmid, Macherey & Nagel) oder PCR-Amplifikat-DNA (NucleoSpin Extract, Macherey & Nagel) eingesetzt. Die Sequenzierung erfolgte unter Verwendung von fluoreszenz-markierten ddNTPs des ABI-Prism™ Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits (Perkin Elmer) mit einem Pop 6 Polymer auf einem ABI-Prism™ 310 cycle sequencer (PE Applied Biosystems).

4.3 Proteinbiochemische Arbeiten

4.3.1 Rekombinante Expression und Aufreinigung von Proteinen

Im Rahmen dieser Arbeit kamen verschiedenste Methoden zur Aufreinigung von Proteinen zum Einsatz. Dabei wurden die Proteine zunächst über Ammoniumsulfatfällung oder Affinitäts-Chromatographie (His-Tag, GST-Tag, Intein-Tag) vorgereinigt, um danach über Gel-Filtration oder Anionenaustauscher-Chromatographie weitergereinigt zu werden. Die Protokolle der Aufreinigungen von MOCS3-GST, MOCS3-RLD (und der Cystein zu Alanin Varianten), MoeB-MOCS3-RLD und NFS1 Δ 35 sind im folgenden beschrieben. Die Reinigungen der Proteine MOCS2A und MOCS2B (Leimkühler *et al.*, 2003) bzw. MoeB (Leimkühler *et al.*, 2001) erfolgten nach den bereits beschriebenen Protokollen.

4.3.1.1 Expression und Aufreinigung von GST-MOCS3

Zur Expression von MOCS3-GST wurde das Plasmid pGEX-6P-1MOCS3 in *E. coli* BL21 (DE3) Zellen transformiert. Mit einer 60 ml Übernachtskultur in LB-Amp wurde eine 6-Liter Kultur angeimpft und die Zellen bei 22 °C wachsen gelassen. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 wurden die Expression mit 100 μ M Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) induziert und für weitere 16 h bei 22 °C kultiviert. Nach der Zellernte durch Zentrifugation wurden die Zellen in 50 ml 10 mM Natriumphosphat, 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,5 resuspendiert und durch dreimalige Passage durch eine French Pressure Cell Press aufgeschlossen. Nach Abzentrifugieren bei 21000 x g für 30 min bei 4 °C wurde der Überstand zu 10 ml Glutathion-Sepharose gegeben und für 2 h bei 4 °C geschwenkt. Danach wurde das Gemisch in eine Tropfsäule überführt und mit 150 ml 10 mM Natriumphosphat, 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 8 gewaschen. Nach der Elution mit 50 mM Tris/HCl, 20 mM Glutathion (reduziert), pH 8,0 in 2,5 ml Schritten wurden die einzelnen Fraktionen in einem SDS-Gel überprüft. Fusionsprotein enthaltene Fraktionen wurden mit PD 10 Säulen in 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7,5 umgepuffert und zur Abspaltung des GST-Tags mit 20 U PreScissionTM Protease bei 4 °C für 16 h inkubiert. Zur Trennung von GST und MOCS3 wurde der Ansatz auf 2 ml ankonzentriert (Centriprep 10) und auf eine Superose 12

Gelfiltrationssäule, äquibriert in 50 mM HEPES, 200 mM NaCl, 2,5 mM DTT, pH 7,5 geladen.

4.3.1.2 Expression und Aufreinigung von MOCS3-RLD

Zur Expression von MOCS3-RLD und den jeweiligen Cystein zu Alanin Varianten wurden das Plasmid pET15b-MOCS3-RLD (und die entsprechenden Varianten) in *E. coli* BL21 (DE3) Zellen transformiert. Mit einer 60 ml Übernachtskultur in LB-Amp wurde eine 6-Liter Kultur angeimpft und die Zellen bei 30 °C wachsen gelassen. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 wurden die Expression mit 50 µM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) induziert und für weitere 16 h bei 30 °C kultiviert. Nach der Zellernte durch Zentrifugation wurden die Zellen in 50 ml 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 2 mM 2-Mercaptoethanol, 1 mM Natrium-Thiosulfat, pH 8,0 resuspendiert und durch dreimalige Passage durch eine French Pressure Cell Press aufgeschlossen. Nach Abzentrifugieren bei 21000 x g für 30 min bei 4 °C wurde der Überstand zu 15 ml Ni-NTA Matrix (Nickel Nitrilotriacetat) gegeben und für 2 h bei 4 °C geschwenkt. Danach wurde das Gemisch in eine Tropfsäule überführt und mit 150 ml 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 2 mM 2-Mercaptoethanol, 1 mM Natrium-Thiosulfat, pH 8,0 und 150 ml 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 2 mM 2-Mercaptoethanol, 1 mM Natrium-Thiosulfat, pH 8,0 gewaschen. Nach der Elution mit 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol, 2 mM 2-Mercaptoethanol, 1 mM Natrium-Thiosulfat, pH 8,0 in 2,5 ml Schritten wurden die einzelnen Fraktionen in einem SDS-Gel überprüft. Zur finalen Reinigung wurden MOCS3-RLD enthaltene Fraktionen vereinigt, mit Centriprep-Konzentratoren (3 kDa, Amicon) auf 2 ml ankonzentriert und auf eine Superose 12 Gelfiltrationssäule, äquibriert in 50 mM HEPES, 200 mM NaCl, 2 mM 2-Mercaptoethanol, 1 mM Natrium-Thiosulfat, pH 8,0 geladen.

4.3.1.4 Expression und Aufreinigung von MoeB-MOCS3-RLD

Zur Expression von MoeB-MOCS3-RLD wurde das Plasmid pET15b-MoeB-MOCS3-RLD in *E. coli* BL21 (DE3) Zellen transformiert. Mit einer 40 ml Übernachtskultur in LB-Amp wurde eine 4-Liter Kultur angeimpft und die Zellen bei 30 °C wachsen gelassen. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 wurden die Expression mit 50 µM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) induziert und für weitere 16 h bei 30 °C kultiviert. Nach der Zellernte durch Zentrifugation wurden die Zellen in 50 ml 50 mM Tris/HCL, 1 mM

EDTA, pH 7,5 resuspendiert und durch dreimalige Passage durch eine French Pressure Cell Press aufgeschlossen. Nach Abzentrifugieren bei 21000 xg für 30 min bei 4 °C wurde der Überstand auf 140 ml mit 50 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT pH 7,5 aufgefüllt und mit 10 ml einer 20 % Streptomycin-Sulfat Lösung bei 4 °C zum Ausfällen der ribosomalen Proteine vorsichtig gerührt. Die ausgefallenen Proteine wurden durch 5-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 10000 xg pelletiert und der Überstand erneut mit 50 mM Tris/HCL, 1 mM EDTA, 5 mM DTT pH 7,5 auf 150 ml aufgefüllt. Danach erfolgte eine 35-prozentige Ammoniumsulfat-Fällung, das ausgefallene Protein wurde erneut pelletiert (s.o.) und unter Schwenken in 15 ml 50 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT pH 7,5 resuspendiert. Danach wurde das Proteingemisch in einen Dialyseschlauch überführt und in 2 x 2 l 50 mM Tris/HCL, 1 mM EDTA, 5 mM DTT pH 7,5 für 4 bzw. 12 h bei 4 °C dialysiert. Das Gemisch wurde daraufhin auf eine 20 ml Q-Sepharose-Säule, äquilibriert in 50 mM Tris/HCl, 5 mM DTT pH7,5 und mit einem linearen Gradienten von 0 – 1 M NaCl über 100 ml eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden in einem SDS-Gel überprüft, MoeB-MOCS3-RLD enthaltende Fraktionen vereinigt und zur finalen Reinigung mit Centriprep-Konzentratoren (10 kDa, Amicon) auf 2 ml ankonzentriert und auf eine Superose 12 Gelfiltrationssäule, äquilibriert in 50 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, 5mM DTT pH 7,5 geladen.

4.3.1.3 Expression und Aufreinigung von Nfs1Δ35

Zur Expression von Nfs1Δ35 wurde die Plasmide pQE80-huNFS1Δ35 und pPH67 in *E. coli* BL21 (DE3) Zellen transformiert. Mit einer 40 ml Übernachtskultur in LB-Amp/Cm wurde eine 4-Liter Kultur angeimpft und die Zellen bei 30 °C wachsen gelassen. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 wurden die Expression mit 50 µM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) induziert, 50 µM Pyridoxalphosphat hinzu gegeben und für weitere 16 h bei 23 °C kultiviert. Nach der Zellernte durch Zentrifugation wurden die Zellen in 30 ml 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8,0 resuspendiert und durch dreimalige Passage durch eine French Pressure Cell Press aufgeschlossen. Nach Abzentrifugieren bei 21000 x g für 30 min bei 4 °C wurde der Überstand zu 7,5 ml Ni-NTA Matrix (Nickel Nitrilotriacetat) gegeben und für 2 h bei 4 °C geschwenkt. Danach wurde das Gemisch in eine Tropfsäule überführt und mit 75 ml 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0 und 150 ml 50 mM

NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0 gewaschen. Nach der Elution mit 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol, pH 8,0 in 2,5 ml Schritten wurden die einzelnen Fraktionen in einem SDS-Gel überprüft. Zur finalen Reinigung wurden MOCS3-RLD enthaltene Fraktionen vereinigt, mit Centriprep-Konzentratoren (10 kDa, Amicon) auf 1 ml ankonzentriert und auf eine Superdex 200 Gelfiltrationssäule, äquilibriert in 50 mM Tris/HCL, 200 mM NaCl, pH 7,5 geladen.

4.3.2 Konzentrierung von Proteinlösungen

Die Ankonzentrierung von Proteinlösungen erfolgte mit Hilfe von Zentrifugations-Konzentratoren. Für kleine Volumina bis 2 ml wurden Centricon-, für bis zu 15 ml Centriprep-Konzentratoren (beide Amicon) mit einem Ausschlussvolumen von 3 - 30 kDa entsprechen den Angaben des Herstellers eingesetzt.

4.3.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes eines Rohextrakts erfolgte nach Bradford (1976) unter Verwendung von BSA (Rinder-Serum-Albumin Fraktion V) als Standard. Ein Aliquot von 5 µl des Rohextraktes wurde in 800 µl H₂O verdünnt, mit 200 µl Bradford-Reagenz (Biorad; Roth) versetzt und für 10 min bei RT inkubiert bevor die Absorption bei 595 nm in einem Spektralphotometer bestimmt wurde. Die Konzentration gereinigter Proteine wurde mit Hilfe des kalkulierten molaren Extinktionskoeffizienten und des Molekulargewichts durch eine Absorptionsbestimmung bei 280 nm am Spektralphotometer nach Gill & Hippel (1990) ermittelt.

4.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinfractionen entsprechend ihres Molekulargewichtes wurden in dieser Arbeit diskontinuierliche Tris/Glycin-SDS-Gelsysteme zwischen 10% und 15% nach Laemmli (1970) verwendet. Die zu analysierenden Proteinlösungen wurden dazu mit 5x SDS-PAGE-Ladepuffer (50% Glycerol; 3,5% SDS; 15% β-Mercaptoethanol; 0,02% Bromphenolblau) versetzt und für 7 min bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte unter Wasserkühlung bei

150-200 V. Im Anschluß daran erfolgte eine Visualisierung der aufgetrennten Proteine im Gel über eine Färbung mit Coomassie-Lösung.

4.3.5 Immunoblot-Analyse

Nach erfolgter SDS-PAGE wurden die Gele für ca. 10 min in Transferpuffer (10% MeOH in 1x Tris/Glycin) äquiliбриert. Für den Transfer der Proteine in einem diskontinuierlichen semi-dry-Blot auf die Trägermembran (HybondTM-P, Amersham/Pharmacia; Roti®-PVDF, Roth) wurden 3 Lagen in Transferpuffer getränktes Whatman-Papier luftblasenfrei auf die Apparatur gelegt bevor die Membran (zuvor mit MeOH benetzt, mit H₂O gewaschen und in Transferpuffer äquiliбриert) und weitere 3 Lagen Whatman-Papier aufgebracht wurden. Das Blotten erfolgte für bei 250 mA mit 3 mA/cm². Nach Waschen des Blots in 1x TBS-Lösung (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl) können die transferierten Proteine reversibel mit PonceauS-Lösung (5% in 1x TBS) angefärbt werden.

Für den immunologischen Nachweis transferierter Proteine wurde die Membran für 1 h bei RT in Blockierungslösung (2% BSA in 1x TBS) inkubiert bevor der 1:3000 in Blockierungslösung verdünnte primäre Antikörper zugegeben wurde. Nach ca. 2-stündiger Inkubation bei RT unter Schwenken wurden unspezifisch gebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen der Membran für je 8 min in TBSTXS (0,1% BSA; 0,1% Triton X-100; 0,05% SDS; in 1x TBS) und einmaliges Waschen für 10 min in 0,8% NaCl entfernt. An eine erneute 5-minütige Blockierung schloss sich die Inkubation mit dem sekundären mit Alkaliner Phosphatase konjugierten Antikörper Anti-Maus-IgG (Sigma) bzw. Anti-Kaninchen IgG (Sigma) für weitere 1,5 h bei RT unter Schwenken an. Nach erneutem Waschen mit TBSTXS und 0,8% NaCl folgte die Färbereaktion der alkalischen Phosphatase durch eine Benetzung der Membran mit ca. 10 ml BCIP/NBT-Reaktionslösung (100 mM Tris-HCl, pH 8,8; 100 mM NaCl; 6,4 mM MgCl₂) nach Zugabe von 66 µl NBT/10 ml (Promega) und 33 µl BCIP/10 ml (Promega). Durch Entfernen der Färbelösung und Waschen mit Wasser wurde die Reaktion gestoppt.

In dieser Arbeit wurden als primärer Antikörper der monoklonale Anti-His-Tag Antikörper aus Maus (Dianova) und der polyklonale Anti-MOCS3-RLD Antikörper aus Kaninchen für die Detektion von rekombinanten Proteinen verwendet.

4.3.6 Protein-Sequenzierung

Eine N-terminale Aminosäuresequenzbestimmung von überexprimierten und aufgereinigten Proteinen erfolgte über automatischen Edman-Abbau am Protein Sequencer ABI 494A Procise HAT (Applied Biosystems) in der GBF Braunschweig. Ausgangsmaterial waren auf PVDF-Membran geblottete Proben von ~ 10 µg Protein.

4.4 Nachweis von Enzymaktivitäten

4.4.1 Rhodanese-Assay

Sulfurtransferase-Aktivität wurde nach der Methode von Westley (1973) bestimmt. Die Reaktionen enthielten neben dem jeweiligen Protein 50 mM Natrium-Thiosulfat und 50 mM Kaliumcyanid in einem Gesamtvolumen von 500 µl in 100 mM Tris/Acetat, pH 8,6. Nach einer Inkubation von 5 – 60 min bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 250 µl Formaldehyd (15%) abgestoppt und das entstandene Thiocyanat durch eine Farbreaktion nachgewiesen. Hierfür wurden 750 µl Sörbo-Reagenz (100g $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \times 9 \text{ H}_2\text{O}$ und 200 ml 65 % HNO_3 pro 1500 ml) zu den Ansätzen gegeben und das komplexierte Thiocyanat (Rhodanid) bei 460 nm im Spektralphotometer durch seinen Extinktionskoeffizienten von $4200 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ bzw. eine Thiocyanat-Eichgerade quantifiziert.

4.4.2 *In vitro* Assay zur Bildung von MPT (Form A-Bestimmung)

Sowohl Molybdopterin (MPT) als auch der Molybdäncofaktor (Moco) selbst sind durch ihr Pteringerüst und die Dithiolen-Gruppe oxidationssensitiv und damit chemisch instabil. Aus diesem Grund findet der Nachweis über ein stabiles Oxidations-Derivat, das durch saure I_2/KI -Oxidation entstehende „FormA-dephospho“, statt. Form A kann direkt aus Moco oder seiner Vorstufe MPT generiert werden. Die saure Oxidation von MPT mit I_2/KI (1M HCl) führt zu dem stabilen Produkt Form A, das eine hohe Fluoreszenz aufweist. Da Fluoreszenzmessungen extrem sensitiv sind, können auch geringere Mengen detektiert werden.

Für die *in vitro* Versuche, Precursor Z (freundlicherweise von J. Santamaria und S. Leimkühler zur Verfügung gestellt) zu MPT- zu konvertieren wurde dieser je nach Ansatz mit MOCS2A, MOCS2B, MoeB, MOCS3, MOCS3-RLD, Mg-ATP, Sulfid bzw. Thiosulfat für 1 ½ h bei Raumtemperatur in 100 mM Tris/HCL in einem

Gesamtvolumen von 400 µl inkubiert und das entstandene MPT als FormA-dephospho detektiert.

Dazu werden 50 µl einer wässrig sauren I₂/KI-Lösung (1% I₂ / 2% KI in 1 M HCl) in einem Reaktionsgefäß vorgelegt, mit dem 400 µl Ansatz aufgefüllt und über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Das ausgefallene Protein und andere Niederschläge werden durch 5-minütige Zentrifugation bei 12000 x g pelletiert. Der Überstand wird in ein anderes Reaktionsgefäß überführt, in dem 56 µl einer frisch angesetzten Ascorbinsäurelösung (1% in ddH₂O) vorgelegt wurden. Durch Zugabe von 200 µl 1 M Tris wird der pH-Wert der Lösung auf ca. 8,3 eingestellt und 16 µl 1 M MgCl₂ zugesetzt. Anschließend werden 0,5 U einer alkalischen Phosphatase (AP)-Lösung dem Ansatz zugegeben und alles für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert, was zu einer Abspaltung der terminalen Phosphat-Gruppe führt.

Um Form A-dephospho in reiner Form zu erhalten, wird mit dem gewonnenen Extrakt eine isokratische Anionenaustauscher-Chromatographie mit quartärem Aminoethyl (QAE) als Matrixmaterial durchgeführt. Das QAE-Sephadex A 25 Material (fine, Sigma) wurde nach Vorschrift in 1 M NaCl gequollen, in leere Nick-Säulen gefüllt (0,5 ml Matrixvolumen), mit ddH₂O mehrfach gewaschen und mit 1 M Ammoniumacetat in die Acetat-Form überführt. Die Matrix wird zunächst vor jeder Reinigung mit 1 M Ammoniumacetat 2x bis zur maximalen Säulenhöhe aufgefüllt, um eventuelle Rückstände zu entfernen und sie vollständig in ihre Acetat-Form zu bringen. Danach wird die Säule 3x bis zum oberen Rand mit filtriertem ddH₂O aufgefüllt. Jetzt erfolgt der Auftrag der Probe, nachdem diese noch einmal für 5 min. bei 12000 x g zentrifugiert wurde, um Protein-Präzipitate zu entfernen. Nach dem völligen Einsinken der Probe spült man die Säule 3x mit filtriertem ddH₂O. Die Elution erfolgt mit 10 mM Essigsäure wobei zunächst ein Totvolumen von 1,4 ml auf die Säule gegeben wird. Nach vollständigem Einsinken wird das gebundene FormA-dephospho mit 2 ml 10 mM Essigsäure eluiert. Zur Untersuchung und Quantifizierung der QAE-gereinigten FormA-dephospho Proben werden 100 µl auf eine HPLC C18 Reverse Phase Column (4,6 x 250 mm, Hypersil-ODS-Particle, 5 µm) aufgetragen. FormA-dephospho weist ein charakteristisches Fluoreszenzspektrum auf und emittiert bei einer Anregungs-Wellenlänge von 370 nm Strahlung bei 450 nm (Johnson *et al.*, 1984). In dieser Arbeit wurde eine HPLC-Anlage der Agilent Technologies Serie 1100 benutzt. Die Flussrate betrug 1 ml/min und der Laufpuffer beinhaltete 90 % 50

mM NH₄-Acetat und 10 % Methanol. Zur Detektion und Quantifizierung der Proben wurde ein Fluoreszenzdetektor der HPLC 1100 Serie von Agilent genutzt.

4.4.3 Nitratreduktase-Overlay zur qualitativen Bestimmung der *E. coli* NR-Aktivität

Der qualitative Nachweis der NR-Aktivität in einzelner *E.coli*-Kolonien wurde mit Hilfe des „NR-Overlay“-Testes nach Lester & DeMoss, 1971 erbracht. Das Prinzip beruht auf der Induktion der Nitratreduktase durch anaerobes Wachstum, während der Kultur auf LB-Festmedium. Danach wird die Platte mit KNO₃ enthaltender Gellösung überschichtet und für 20 min. inkubiert. Über diese Schicht wird eine weitere gegossen, wobei das Produkt der Reduktion von Nitrat zu Nitrit mittels einer Farbreaktion nachgewiesen wird.

Die zu testenden *E. coli* Kulturen wurden für mindestens 2 h auf LB-Platten (evtl. Antibiotika) in einer Anaerob-Kammer wachsen gelassen, bevor sie mit 6 ml einer ca. 50 °C warmen Lösung aus 3 ml 1 M Na-Formiat, 1% KNO₃ und 3 ml 1,5% H₂O-Agarose überschichtet wurden. Nach einer Inkubation von 2 h bei 37 °C erfolgte die Farbreaktion durch überschichten mit 6 ml einer Lösung aus 1,5 ml Sulfanilsäure (4%), 1,5 ml N-(1-Naphtyl)-ethylen-diamin-hydrochlorid (0,05%) und 3 ml H₂O-Agarose.

4.4.4 Quantitativer Nitratreduktase-Assay

Zur quantitativen Bestimmung der NR-Aktivität wurde der *E.coli* Nitratreduktase Benzylviologen als artifizieller Elektronendonator angeboten (Jones & Garland, 1977). Um Benzylviologen in seine reduzierte Form zu überführen wurde Natriumdithionit hinzugegeben. Benzylviologen weist im reduzierten Zustand eine charakteristische Violettfärbung mit einem Absorptionsmaximum bei ~ 600 nm auf. Die Übertragung von 2 Elektronen des Benzylviologens auf die aktive NR ruft eine proportionale Abnahme der Färbung durch die Oxidation des Benzylviologens hervor. Bei der Reaktion werden 2 Mol Benzylviologen pro Mol Nitrat umgesetzt. Zur Auswertung wird die Absorptionsabnahme im Ansatz vermessen. Mittels der Steigung, dem Probenvolumen, dem molaren Extinktionskoeffizienten von Benzylviologen, des Proteingehalts der Probe und der Schichtdicke des Reaktionsgefäßes wird die Aktivität errechnet.

Zur Durchführung wurden zunächst 5 ml Übernacht-Kulturen der zu testenden *E. coli* Kolonien in LB (evtl. Antibiotika) und 15 mM Na_2NO_3 angeimpft und bei 37 °C geschüttelt. Mit 100 µl dieser Übernacht-Kultur wurden 5 ml LB (evtl. Antibiotika), 1 µl 100 mM IPTG, 75 µl 1 M Na_2NO_3 angeimpft und für 7 – 9 h bei 30 °C geschüttelt. Nach Ernte der Zellen durch zweimaliges Abzentrifugieren von 1,5 ml in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß und anschließenden Resuspendieren in 1,5 ml Kultur wurden durch 1-minütiges sonifizieren die Zellen aufgeschlossen. Die Proteinkonzentration der Probe wurde im Bradford-Assay bestimmt und 100 µl des Lysats in die Reaktionsgefäße (15 ml Glasröhrchen) pipettiert und für eine Stunde in einer Anaerob-Kammer stehen gelassen. Alle folgenden Schritte folgten im Anaeroben mit Sauerstoff-freien Lösungen. Zu dem 100 µl Lysat wurde ein Mix aus 1,8 ml H_2O , 40 µl 1 M Tris (pH 6,8), 20 µl KNO_3 und 40 µl 15 mM Benzylviologen zugegeben und die Gefäße zur Messung am Photometer luftdicht mit einem Stopfen verschlossen. Zu dem Ansatz wurden dann 2,5 µl Dithionit-Lösung (Spatelspitze Dithionit in 10 ml anaeroben H_2O , in Anaerob-Kammer angesetzt) durch den Verschluss pipettiert, kurz geschwenkt und die Reaktion bei 600 nm für 60 s im Photometer verfolgt.

4.4.5 Gekoppelter Rhodanese-Sulfit-Oxidase Assay

Zum Nachweis von Sulfit, welches bei der Rhodanes-katalysierten Reaktion mit Thiosulfat entsteht, sollte dieses freiwerdende Sulfit durch die Aktivität der humanen Sulfit-Oxidase (SOX) zu Sulfat oxidiert werden und die frei werdenden Elektronen auf Cytochrom c übertragen werden.

Es wurden je nach Ansatz 1 µg SOX (freundlicherweise von S. Leimkühler zur Verfügung gestellt), 400 µM Sulfit, 20 mM Thiosulfat, 30 µM Cyanid und 10 µM MOCS3-RLD in einem Gesamtansatz von 1 ml in 20 mM Tris/Acetate, pH 8,0 für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit 52,5 µM Cytochrom c gestartet und die Reduktion von Cytochrom c im Photometer bei 550 nm für eine Minute verfolgt. Aus der erhaltenen linearen Steigung der Cytochrom c Reduktion (Extinktionskoeffizient $19,600 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) wurde die Sulfit-Oxidase Aktivität errechnet. Für die turnover Experimente mit Cyanid wurde eine sehr geringe Cyanid-Konzentration von 30 µM gewählt, da höhere Konzentrationen die Sulfit-Oxidase zu stark gehemmt hätten (G. Schwarz, persönliche Mitteilung).

4.4.6 PAR-Assay zur Zinkbestimmung

Zum Nachweis der Zinkbindung von MOCS3 wurde der PAR-Assay durchgeführt, wobei vorher gebundenes Zink durch Denaturierung und Erhitzen aus dem Protein gelöst wird und danach durch Reaktion mit PAR (4-(2-Pyridylazo)resorcinol) nachgewiesen wird. PAR chelatiert divalente metallische Kationen und ändert dabei sein Absorptionsmaximum bei 500 nm.

1 mg Protein (MOCS3-GST mit GroEL komplexiert, s. Abb.2.1) wurde an 200 µl Gluthatione fast flow Matrix (Amersham Pharmacia) gebunden und in eine entleerte Nick-Säule überführt. Nach Waschen mit 5 ml 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, pH 8,0 wurden entweder 1 ml 0,1 mM Zink-Acetat-Lösung oder 0,1 mM EDTA-Lösung auf die Säule gegeben und der Ansatz wurde nach Einsinken der Lösungen für 30 min stehen gelassen. Danach folgte ein erneutes Waschen mit 10 ml 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, pH 8,0 und die Elution mit 500 µl 100 mM Tris/HCl, 25 mM Glutathion, pH 7,2. Die Proteinkonzentration wurde bestimmt und das Protein mit einer Konzentration von 5 µM in 4 M GuHCl, 10 mM HEPES bei 90 °C für 10 min inkubiert. Nach Abkühlung folgte die Zugabe von 20 µl 5 mM PAR und nach 10 min wurde die Absorption im Photometer bei 500 nm bestimmt. Kontrollexperimente wurden nach gleichem Protokoll ohne Protein durchgeführt. Mit Zink-Konzentrationen von 0, 0,5, 1, 2, 5, 10 und 50 µM wurde eine Eichgerade erstellt und damit der Zinkgehalt von MOCS3-GST bestimmt.

4.4.7 Detektion freier Sulfhydryl-Gruppen mit DTNB

Sulfhydryl-Gruppen von nativen und denaturierten MOCS3-RLD Varianten wurden durch die Methode nach Ellman (1959) nachgewiesen. Die Ansätze enthielten 10 µM Protein in 50 mM HEPES, 200 mM NaCl, pH 8,0 und 400 µM DTNB in einem Gesamtvolumen von 1 ml. Zur Denaturierung wurden 0,5 g Guanidinium Hydrochlorid hinzugefügt (5 M Endkonzentration). Nach einer Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur wurde die Anzahl der Sulfhydryl-Gruppen durch die Bildung des gelben Anions der 5-Thio-2-Benzoessäure bei 412 nm durch eine Cystein-Eichgerade bzw. den Extinktionskoeffizienten von $13,600 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ quantifiziert.

4.4.8 Photometrischer Nachweis der Reduktion von Nfs1Δ35

Wird eine L-Cystein-Desulfurase mit L-Cystein inkubiert, so kommt es im Zuge der katalysierten Reaktion zu einer Oxidation des gebundenen PLP-Kofaktors. Diese

Oxidation kann photometrisch verfolgt werden da sie eine Abnahme der Absorption bei 420 nm und eine Zunahme der Absorption bei ca. 320 nm zur Folge hat.

Es wurde von 1mg NFS1Δ35 in 1 ml in einer Quarzküvette ein Absorptionsspektrum von 250 – 750 nm aufgenommen. L-Cystein Zugabe erfolgte in 0,1 mM Schritten mit jeweils 1 Minute Wartezeit bis zur Messung des Spektrums. Die Prozedur wurde durchgeführt, bis sich keine Änderung des Spektrums mehr zeigte.

4.4.9 H₂S-Nachweis zur Bestimmung der L-Cystein-Desulfurase Aktivität

Um die Schwefeltransfer-Reaktion von L-Cystein mit DTT als Akzeptor zu zeigen, wurde das dabei entstehende H₂S durch die Methylenblau-Methode (Fogo & Popowsky, 1949) nachgewiesen.

Die Ansätze enthielten 50 µg Protein, 1 mM L-Cystein, 2 mM DTT und 1 mM PLP in 20 mM Tris/HCl, pH 9,0 in einem Gesamtvolumen von 350 µl. Nach einer Inkubation von 1 h bei 37 °C wurden 50 µl Zink-Acetat-Lösung (5,5% Zn-Acetat x 2 H₂O und 1,4% Na-Acetat x 3 H₂O in H₂O) zugegeben und für 5 min inkubiert. Danach folgte die Zugabe von 50 µl DMPD-Lösung (0,1% N,N-Dimethyl-1,4-phenylendiamin-dihydrochlorid in 6 N HCl) und anschließend 50 µl Eisen(III)-Lösung (10% Ammoniumeisen(III)sulfat-Dodekahydrat in 0,5 M H₂SO₄). Nach einer Inkubation von 1 h bei 23 °C wurde präzipitiertes Material abzentrifugiert und die Absorption bei 667 nm gemessen.

4.5 Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Die Massenspektroskopischen Analysen in dieser Arbeit wurden an der GBF-Braunschweig bei Dr. Manfred Nimtz durchgeführt. Die Funktionsweise eines Massenspektrometers (MS) kann wie folgt skizziert werden: Die zu untersuchende Probe wird in das MS eingebracht, verdampft und ionisiert. Als bewegte geladene Teilchen lassen sich die Ionen in einem Analysator auf verschiedene Weise nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis auftrennen und anschließend detektieren. Der Aufbau eines MS lässt sich somit in vier Hauptkomponenten aufgliedern: Probenaufgabesystem, Ionisierung, Massentrennung und Detektion. Bei einem Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometer erfolgt die Desolvatisierung der Ionen durch kontinuierliche Zuführung des gelösten Analyten an die Spitze einer leitfähigen Kapillare. Das angelegte elektrische Feld zwischen Kapillarspitze und

Massenspektrometer durchdringt die Analytlösung und trennt die Ionen ähnlich wie bei der Elektrophorese. Bei ausreichend hohem elektrischen Feld ist der Flüssigkeitskonus stabil und emittiert von seiner Spitze einen kontinuierlichen, filamentartigen Flüssigkeitsstrom, dieser wird mit Entfernung zur Anode instabil und zerfällt, wobei die Oberfläche der entstehenden Tröpfchen je nach Polarisierung mit positiven oder negativen Ladungen angereichert ist, es tritt ein kontinuierlicher Lösungsmittelverlust durch Verdampfen auf, wodurch die Ladungsdichte der Oberfläche zunimmt. Es kommt zu einem spontanen Zerfall der Tröpfchen durch Coulomb-Explosionen und schließlich zur Desolvatisierung der Analytmoleküle beim Transfer in das Massenspektrometer.

Für die Messungen wurden 1-3 µl Aliquots der Protein-Lösungen (in 5 mM NH₄Ac-Puffer, pH 8,0) 1:1 mit Methanol verdünnt und auf eine Konzentration von 1-10 pmol/µl mit 10% Ameisensäure verdünnt. Die Proben wurden in eine goldbeschichtete Nanospray-Glaskapillare, welche vor dem Eingangsloch eines QTOF-II Instrumentes (Micromass, UK) platziert wurde, gegeben. Ca. 1000 V wurden angelegt und die Ionen im „Time-of-Flight“-Analysator getrennt. Für die MS/MS Experimente wurden die Eltern-Ionen vom Quadrupol-Massenfilter ausgewählt und der Dissoziation durch Kollision zugeführt. Die Trennung der Tochter-Ionen erfolgte wiederum im „Time-of-Flight“-Analysator. Die resultierenden Spektren wurden mit der MaxEnt1 Software (Micromass, UK) dargestellt und mit dem MaxEnt3 Programm bearbeitet. Die Peptidsequenzen wurden mit der PepSeq Software bestimmt. Der tryptische Verdau der Protein-Lösungen für die MS/MS Analysen erfolgte durch 1:1 Inkubation mit einer Trypsin-Lösung (Promega, 2 µg/ml in 50 mM NH₄HCO₃) über Nacht bei 37 °C. Die Peptide wurden mit C-18 ZipTip-Pipetten (Millipore) entsalzt und nach Waschen mit 0,1% Ameisensäure erfolgte die Elution mit 10 µl 0,5% Ameisensäure (in 65% Methanol).

4.6 Two-Hybrid Screen

Das „Yeast-Two-Hybrid“-System bietet die Möglichkeit, Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* zu untersuchen. Viele eukaryotischen Transkriptionsfaktoren sind aus zwei unabhängigen Domänen, der DNA-Bindungsdomäne (BD) und der Aktivierungsdomäne (AD), aufgebaut. Im „Two-Hybrid“-System sind diese Domänen getrennt und an zu untersuchende Proteine gekoppelt. Diese Hybrid-Proteine sind

alleine jedoch transkriptionell inaktiv. Die DNA-Bindungsdomäne kann zwar an eine spezifische Promotor-Sequenz binden, aber erst durch eine Interaktion der zu untersuchenden Proteine kommt es zur Assoziation mit der Aktivierungsdomäne, was dann zur einer Initiierung der Transkription führt. Über Reportergene, die hierdurch angeschaltet werden, lässt sich die Interaktion nachweisen. Das hier benutzte MATCHMAKER 3 „Two-Hybrid“-System (Clontech, Heidelberg) basiert auf dem Hefe-Transkriptionsfaktor GAL4, dessen DNA-Bindungsdomäne unter Kontrolle der Promotor-Sequenz UAS („upstream activating sequence“) von Gal1 steht, an die für den Nachweis einer Interaktion bzw. zur Selektionierung erforderliche Reportergene lacZ, HIS3, MEL1 und ADE2 gekoppelt sind. Das lacZ-Gen vermittelt eine β -Galactosidase-Aktivität, das HIS3-Gen erlaubt das Wachstum auf Histidin-freiem Medium, ADE2 ermöglicht Wachstum auf Adenin-freiem Medium und MEL1 vermittelt eine α -Galaktosidase-Aktivität.

Um mittels des Hefe-Two-Hybrid Systems nach Interaktionspartnern für ein bekanntes Protein zu suchen, wird die cDNA-Sequenz des bekannten Proteins (Zielprotein) in den Hefeexpressionsvektor kloniert, welcher für den DNA-Bindungsdomänen-Fusionsanteil kodiert (pGBKT7). Zur Identifizierung interagierender Proteine wird eine, in den Hefe-Expressionsvektor (pACT2) mit dem Transkriptionsaktivierenden Fusionsanteil klonierte cDNA-Bank verwendet (Clontech). Es wurde zunächst der Vektor mit dem Zielprotein in kompetente AH109 Zellen transformiert, diese dann erneut kompetent gemacht und mit der cDNA-Bank in einem Library Scale Ansatz transformiert. Der Transformationsansatz wurde auf Platten mit SD-Selektionsmedium ausplattiert. Bei der Selektion wurden zwei verschiedenen stringente Medien gewählt: Hoher Selektionsdruck: SD –Leu –Trp –His –Ade + X- α -Gal und Niedriger Selektionsdruck: SD –Leu –Trp –His. Nur stark interagierende Proteine ermöglichen ein Wachstum auf Platten mit höchstem Selektionsdruck, wenn der Transformationsansatz direkt auf diese Platten ausgebracht wird. Deshalb wurde der Ansatz zunächst auf Medium mit mittlerem Selektionsdruck ausplattiert, um bei Wachstum diese dann auf Platten mit höchstem Selektionsdruck auf Interaktion zu überprüfen. Daraufhin wurden die cDNA enthaltenden Vektoren aus den positiven Klonen isoliert und nach Zwischen-Transformation in DH5 α durch Sequenzierung identifiziert.

4.6.1 Herstellung kompetenter *S. cerevisiae* Zellen

Für die Herstellung kompetenter Hefezellen werden Übernacht-Vorkulturen in YPD-Medium (eventuell Selektionsantibiotikum oder SD-Selektionsmedium) bei 30 °C und 240 rpm angeschüttelt. Aus dieser Vorkultur wird eine 300 ml-Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0,2-0,4 angeimpft und für weitere 3 Stunden bei 30 °C und 240 rpm inkubiert. (Nach dieser Zeit sollte die OD₆₀₀ bei mindestens 0,5 liegen). Nun werden die Zellen bei 1000 x g, 5 min und RT pelletiert und vorsichtig in 25 ml sterilem H₂O resuspendiert. Die Zellen werden erneut wie oben pelletiert und das Pellet in frisch angesetzter, sterilen TE/LiAc-Lösung (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 100 mM Lithiumacetat, pH 7,5) resuspendiert. Die Kompetenz der Zellen bleibt für ca. 3 h bei RT erhalten.

4.6.2 Transformation von *S. cerevisiae*

Für die Transformation der Hefe werden 100 ng Plasmid-DNA und 100 µg ssLachs-Sperma-DNA in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße vorgelegt. Pro Ansatz werden 100 µl kompetente Hefezellen und 600 µl frisch angesetzte PEG/LiAc-Lösung (Endkonzentration: 40% PEG, 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 100 mM LiAc, pH 7,5) zugesetzt. Nach 30minütiger Inkubation bei 30 °C und 200 rpm werden 70 µl DMSO zugesetzt. Es folgt eine Hitzeschock-Behandlung bei 42 °C für 15 min, gefolgt von einer Abkühlung auf Eis. Die Zellen werden in einer Mikrofuge bei 14000 x g für 10 s pelletiert, der Überstand wird verworfen und die Zellen in 250 µl sterilem 10 mM Tris/HCl, 1mM EDTA, pH 7,5 resuspendiert. Zur Selektion der transformierten Hefeklonen wird der Transformationsansatz auf YPD-Antibiotikum-Agarplatten oder SD-Selektions-Agarplatten ausplattiert und für 3-5 Tage bei 30 °C inkubiert.

4.6.3 „Library Scale“ Transformation

Mehrere Hefekolonien wurden in 1 ml YPD-Medium unter vortexen gelöst, bis keine Klumpen mehr zu erkennen waren. Mit dieser 1 ml Zellkultur wurden 30 ml YPD-Medium angeimpft und für 16-18 h bei 30 °C und 250 rpm inkubiert, bis die stationäre Phase erreicht war (OD₆₀₀ > 1,5). Mit dieser ÜN-Vorkultur wurden dann 300 ml YPD-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,2-0,3 eingestellt und für weitere 3 h bei 30 °C und 250 rpm geschüttelt. Nach diesen 3 h sollte die OD₆₀₀ bei 0,5 ± 0,1 liegen. Die Zellen wurden bei 1000 x g und RT für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 50 ml sterilen H₂O resuspendiert und erneut unter gleichen Bedingungen

pelletiert. Das Pellet wurde in 800 µl frisch präparierter, steriler TE/LiAc-Lösung (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 100 mM LiAc, pH 7,5) resuspendiert und die PEG/LiAc-Lösung (Endkonzentration: 40% PEG, 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 100 mM LiAc, pH 7,5) vorbereitet. Es wurden folgende Komponenten gemischt: 50 µg cDNA-Bankvektor, 2 mg ssHeringsperma-DNA und 800 µl kompetente Zellen. Der ganze Ansatz wurde gründlich gevortext, dann wurden 6 ml der sterilen PEG/LiAc-Lösung hinzugegeben und erneut unter vortexen gemischt. Der Ansatz wird bei 30 °C für 30 min mit 200 rpm inkubiert. Es werden 7 ml DMSO hinzugefügt und der Ansatz unter vorsichtigem Schwenken in einem Wasserbad bei 42 °C für 15 min einem Hitzeschock unterzogen. Die Zellen wurden für 1-2 min auf Eis abgekühlt und bei RT mit 1000 x g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 10 ml YPD resuspendiert und auf SD-Selektionsplatten ausplattiert.

4.6.4 Plasmidisolierung aus *S. cerevisiae*

3 ml YPD (oder entsprechendes Selektionsmedium) werden angeimpft und die Kultur für 1-3 Tage bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen aus 1,5 ml Suspension werden für 5 s in einer Tischzentrifuge pelletiert, und die Zellen nach dem Dekantieren des Überstandes in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lysispuffer, 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und ca. 0,3 g Säure-gewaschene Glasperlen (Sigma), wird der Ansatz für 2 min gevortext und anschließend für 5 min bei 14000 rpm und RT zentrifugiert. Die wässrige Phase wird mit 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat und 2,5 Vol. 96% Ethanol (-20 °C) versetzt und die DNA für 30 min bei -20°C präzipitiert. Durch Zentrifugation für 5 min bei 14000 rpm und 4 °C wird die DNA pelletiert, mit 70% Ethanol gewaschen, erneut auf gleiche Weise zentrifugiert, anschließend getrocknet und für die Elektroporation in 20 µl H₂O aufgenommen.

4.6.5 β-Galaktosidase-Assay

Die auf den Selektionsplatten gewachsenen Hefekolonien wurden auf Nitrocellulose Membranfilter (Pall Gelman Sciences, Rossdorf) übertragen und ihre Zellwände durch kurzfristiges Einfrieren in flüssigem Stickstoff aufgeschlossen. Die derart behandelten Filter wurden auf ein mit frisch angesetztem Reaktionspuffer (50 ml Z-Puffer (16,1 g/l Na₂HPO₄ x 7 H₂O, 5,5 g/l NaH₂PO₄ x H₂O, 0,75 g/l KCl, 0,246 g/l MgSO₄ x 7 H₂O, pH 7,0), 135 µl β-Mercaptoethanol, 835 µl X-β-Gal (2% in DMSO)

getränktes Filterpapier aufgebracht und für bis zu 8 h bei 30 °C inkubiert. Während dieser Zeit wird regelmäßig auf Blaufärbung kontrolliert. Eine Blaufärbung innerhalb der 8 Stunden zeigt eine Interaktion der beiden Proteine an.

4.6.6 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen für die Elektroporation

Bei der Transformation mittels Elektroporation werden durch die hohe Spannung kurzfristig Poren in der Zellmembran erzeugt, durch welche die DNA in die Zelle eindringen kann. Die Herstellung kompetenter Zellen beruht daher auf der Entfernung der dabei störenden Salze. Dieses wird durch Waschen mit dest. H₂O erreicht. Für die Transformation mittels Elektroporation ist es empfehlenswert, die kompetenten Zellen immer frisch herzustellen. Dieser Ansatz ergibt 10 Aliquots, die aber auch durch Aufnehmen in 10%-igem Glycerol und Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei –70 °C gelagert werden können.

(100 ml LB werden mit 1 ml ÜN-Kultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37 °C und 240 rpm wachsen gelassen (ca. 3 h). Den Ansatz kühlt man für 30 min auf Eis ab, pelletiert die Zellen bei 4.000 x g ; 4 °C für 15 min und dekantiert das LB-Medium möglichst vollständig ab. Es erfolgen Waschschrte mit eiskaltem sterilen dest. H₂O: 2 x 100 ml (1 Vol.) 1 x 50 ml (1/2 Vol.) 1 x 2 ml (1/50 Vol.). Das Pellet wird jeweils auf Eis möglichst vorsichtig resuspendiert und erneut pelletiert. Die Zellen werden in 300 µl dest. H₂O (zum Einfrieren in 10% Glycerol) aufgenommen und in 40 µl Aliquots aufgeteilt.

4.6.7 Elektroporation

Für jeden Ansatz wird 1 ml steriles SOC-Medium in einem sterilen Reaktionsgefäß auf 37 °C vorgewärmt. Die Küvetten für die Elektroporation werden rechtzeitig auf Eis vorgekühlt. Frisch hergestellte elektrokompetente Zellen werden auf Eis gehalten, eingefrorene auf Eis aufgetaut. Anschließend gibt man 1-4 µl der zu transformierenden, salzfreien DNA dazu, durchmischt den Ansatz und inkubiert für 5 min auf Eis. Danach wird jeder Ansatz kompetenter Zellen mit der DNA in eine Küvette überführt. Einstellungen an den Geräten:

PULSE CONTROLLER II (BIO Rad)	Widerstand	200 Ω
GENE PULSER II (BIO Rad)	Kapazität	25 µF
Set Volts	Spannung	2,5 kV

Die Küvette wird außen mit einem Kleenex abgetrocknet, mit der „Nase“ nach vorne in den Schieber gestellt und bis zum Anschlag in das Gerät geschoben. Die Felder >Actual Volts< und >Time Const< gleichzeitig drücken. Der Widerstandswert der Probe erscheint im Display. Er sollte bei 200 Ω liegen, zu hohe Salzkonzentration in der Lösung verringern diesen Wert. Er darf auf keinen Fall unter 100 Ω liegen. >Set Volts< drücken \Rightarrow 2,5 kV (eingestellter Wert) erscheint im Display. Beide roten Knöpfe (Pulse) bis zum Pfeifton gemeinsam gedrückt halten. Sofort nach der Elektroporation wird mit einer Pipette etwa 400 μ l des vorgewärmten SOC-Mediums in die Küvette gegeben. Anschließend überführt man das gesamte Volumen der Küvette in das vorgewärmte Reaktionsgefäß mit SOC-Medium und lässt die Zellen für 1 h bei 37 °C und 240 rpm regenerieren. Im Display leuchtet der Wert für die erhaltene Impulslänge in msec auf. Dieser Wert sollte notiert werden, da er ein Maß für die Qualität der Transformation ist. Das Optimum liegt bei Werten zwischen 4,8 und 5,0. Bei zu geringen Werten war die Salzkonzentration zu hoch und kann durch eine geringere Menge an eingesetzter DNA reduziert werden. Je nach eingesetzter Menge DNA und dem bei der Transformation erhaltenen Wert für die Impulslänge, werden 100-400 μ l des Ansatzes auf LB-Antibiotikum-Platten ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Bei Mehrfachverwendung der Küvetten werden diese mit Wasser und Ethanol gereinigt und im trockenen Zustand für 5-10 min mit UV-Licht zur Dekontamination bestrahlt.

4.7 Arbeiten mit humanen- und Maus-Zelllinien

Die Arbeiten zur Lokalisation von MOCS3, MOCS2A und MOCS2B wurden in den Laboren der AG Jokusch an der TU-Braunschweig durchgeführt. Zell-Linien und sämtliche Medien wurden zur Verfügung gestellt.

4.7.1 Vorbereitung der Hela- und C2C12-Zellen zur Transfektion

Die Zellen von dicht bewachsenen Kulturplatten von Hela und C2C12-Zellen wurden mit 2 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung für 3 min inkubiert, um die Zellen vom Untergrund zu lösen. Die Reaktion wurde mit 8 ml Dulbecco's Medium (+ 10%FCS) Medium abgestoppt und die Zellzahl in einem Zellzähler bestimmt. Die Zellzahl wurde mit FCS-Medium auf $1,5 \times 10^4$ Zellen pro ml eingestellt und in einer 12-Well Schale pro Well $1,5 \times 10^4$ Zellen ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium von den

Zellen abgesaugt und frisches hinzugegeben. 3 h nach diesem Mediumwechsel wurden die Zellen zur Transfektion eingesetzt.

4.7.2 Transiente Transfektion von Hela- und C2C12-Zellen

Beide Zelllinien wurden nach dem Prinzip der Calciumphosphat-Copräzipitation transfiziert, wobei die Lösungen und die Vorgehensweise sich in mehreren Punkten unterschieden.

HBS-Methode zur Transfektion von C2C12 Zellen:

Alle Lösungen wurden auf 37 °C vorgewärmt. Dann wurden pro Well 4 µg DNA, 136 µl HBS-Puffer (8g NaCl, 0,37g KCl, 0,115g Na₂HPO₄, 5g HEPES in 1l H₂O, pH 7,05) und 8,6 µl 2M CaCl₂-Lösung in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß durch gründliches Vortexen gemischt. Nach 20 min wurde der Ansatz noch einmal kurz gevortext und vorsichtig in kleinen Tropfen auf die Zellen pipettiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mehrmals mit PBS-Puffer gewaschen und neues Medium hinzugegeben.

2 x HEBS Methode zur Transfektion von Hela-Zellen:

Alle Lösungen wurden auf 37 °C vorgewärmt. In einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 1µg DNA mit H₂O auf 50µl aufgefüllt. Dann wurden 5 µl 2,5M CaCl₂-Lösung hinzugegeben und für 5 s gevortext. Dieser Ansatz wurde unter Vortexen in ein weiteres Eppendorf-Reaktionsgefäß tröpfchenweise pipettiert und dann für 40 min erschütterungsfrei stehen gelassen. Dann wurde der Ansatz noch einmal kurz gevortext und vorsichtig in kleinen Tropfen auf die Zellen pipettiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mehrmals mit PBS-Puffer gewaschen und neues Medium hinzugegeben.

4.7.3 Vorbereitung der transfizierten Zellen für die Fluoreszenz-Mikroskopie

Nach 18 – 36h nach der Transfektion wurden die Zellen für die Fluoreszenz-Mikroskopie fixiert. Dazu wurden die Zellen 3 x mit PBS-Puffer gewaschen und für 20 min mit 2 ml 2% Paraformaldehyd (in PBS) in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert. Nach erneutem 3 x Waschen mit PBS-Puffer erfolgte eine Inkubation mit 0,2% Triton X-100 (in PBS) bei 37 °C in einer feuchten Kammer. Danach wurde erneut 3 x mit PBS-Puffer gewaschen. Zellen, welche einer Antikörper-Behandlung unterzogen werden sollten wurden jetzt mit 2 ml einer 1% BSA-Lösung für 15 min inkubiert. Danach wurde die BSA-Lösung zum größten Teil abgesaugt und der Anti-Flag-Antikörper in einer 1:5000 Verdünnung auf die Zellen gegeben. Nach einer

Inkubation von 40 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer erfolgte 3-maliges Waschen mit PBS und der zweite Antikörper (Anti-Maus, Tritc-gekoppelt) in einer 1:250 Verdünnung in 1% BSA-Lösung wurde auf die gleiche Weise mit den Zellen inkubiert. Nach erneutem 3-maligen Waschen mit PBS-Puffer waren die Zellen jetzt bereit für das Aufbringen auf einen Objektträger. Dazu wurden die Deckgläschen mit einer Pinzette aus den Well-Schalen genommen, 2-3 x kurz in H₂O getaucht, vorsichtig abgetupft und mit der Oberseite auf einen Tropfen Mowiol auf einen Objektträger abgelegt. Die so präparierten Objektträger waren nach 24 h bereit zur Fluoreszenz-Mikroskopie.

5. Literaturverzeichnis

Bartel P.L., Fields S. (1995): Analyzing protein-protein interactions using two-hybrid system. *Methods Enzymol.*; **254**: 241-63.

Bartels, H. (1930): Molybdän als Katalysator der biologischen Stickstoffbindung. *Arch. Mikrobiol.*; **1**: 333-342

Bittner F, Oreb M, Mendel RR. (2001) ABA3 is a molybdenum cofactor sulfurase required for activation of aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem.* **276**, 40381-40384.

Bordo, D., Deriu, D., Colnaghi, R., Carpen, A., Pagani, S. & Bolognesi, M. (2000). The crystal structure of a sulfurtransferase from *Azotobacter vinelandii* highlights the evolutionary relationship between the rhodanese and phosphatase enzyme families. *J. Mol Biol.* **298**, 691–704.

Bordo, D., & Bork, P. (2002) The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily. *Embo reports* **3**, 741-746.

Boyington, J.C., Gladyshev V.N., Khangulov S.V., Stadtman T.C., Sun P.D. (1997): Crystal structure of formate dehydrogenase H: Catalysis involving Mo, molybdopterin, selenocystein and an Fe₄S₄ cluster. *Science* **275**: 1305-1308.

Börner G., Karrasch M., Thauer R.K. (1991): Molybdopterin adenine dinucleotide and molybdopterin hypoxanthine dinucleotide in formylmethanofuran dehydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *FEBS*; **290**: 31-34

Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**, 248-254.

Cohen, H. J., Betcher-Lange, S., Kessler, D. L. & Rajagopalan, K. V. (1972) Hepatic sulfite oxidase. Congruency in mitochondria of prosthetic groups and activity. *J. Biol. Chem.* **247**, 7759–7766.

Collison M.W., Beidler D., Grimm L.M., Thomas J.A. A comparison of protein S-thiolation (protein mixed-disulfide formation) in heart cells treated with t-butyl hydroperoxide or diamide. *Biochim Biophys Acta*.1986 Jan 23;**885(1)**:58-67

Ellman, G. L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* **82**, 70-7.

Fauman, E. B., Cogswell, J. P., Lovejoy, B., Rocque, W. J., Holmes, W., Montana, V. G., Piwnica-Worms, H., Rink, M. J., and Saper, M. A. (1998) Crystal structure of the catalytic domain of the human cell cycle control phosphatase, Cdc25A. *Cell* **93**, 617-25.

Fogo, J. K., & Popowsky, M.,. Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide - methylene blue method. *Anal. Chem.* **21** (1949) 732.

Furukawa K., Mizushima N., Noda T., Ohsumi Y. A protein conjugation system in yeast with homology to biosynthetic enzyme reaction of prokaryotes. *J Biol Chem.* 2000 Mar 17;**275**(11):7462-5

Geoghegan, K.F., Dixon, H.B., Rosner, P.J., Hoth, L.R., Lanzetti, A.J., Borzilleri, K. A., Marr, E.S., Pezzullo, L.H., Martin, L.B., LeMotte, P.K., McColl, A.S., Kamath, A.V., and Stroh, J.G. (1999) Spontaneous alpha-N-6-phosphogluconoylation of a "His tag" in *Escherichia coli*: the cause of extra mass of 258 or 178 Da in fusion proteins. *Anal Biochem* **267**, 169-84.

Gill G.C., Hippel P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficient from amino acid sequence data. *Anal Biochem.* **182**, 319-326.

Girdwood D.W., Tatham M.H., Hay R.T. SUMO and transcriptional regulation. *Semin Cell Dev Biol.* 2004 Apr;**15**(2):201-10.

Gray, T.A. & Nicholls, R.D. (2000). Diverse splicing mechanisms fuse the evolutionarily conserved bicistronic *MOCS1A* and *MOCS1B* open reading frames. *RNA* **6**, pp. 928-936.

Gross-Hard, S. & Reiss, J. (2002). The bicistronic *MOCS1* gene has alternative start codons on two mutually exclusive exons. *Mol Genet Metab* **76**, pp. 340-343.

Gupta, U.C. (ed) (1997): Molybdenum in Agriculture. Cambridge University Press.

Hanahan D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* **166**, 557.

Hänzelmann, P., Schwarz, G. & Mendel, R.R. (2002). Functionality of alternative splice forms of the first enzymes involved in human molybdenum cofactor biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **277**, pp. 18303-18312.

Hille, R. (1996): The mononuclear molybdenum enzymes. *Chem Rev* **96**: 2757-2816.

Hinton, S.G. & Dean D.. (1990): Biogenesis of Molybdenum cofactors. *CRC rev. Microbiol.*, **17**: 169-188

Hochstrasser M. 2000 Biochemistry. All in the ubiquitin family. *Science.* 2000 Jul 28;**289**(5479):563-4

Huang D.T., Walden H., Duda D., Schulman B.A. Ubiquitin-like protein activation. *Oncogene.* 2004 Mar 15;**23**(11):1958-71

Ichida, K., Matsumura, T., Sakuma, R., Hosoya, T. & Nishino, T. (2001). Mutation of human molybdenum cofactor sulfurase gene is responsible for classical xanthinuria type II. *Biochem Biophys Res Commun* **282**, pp. 1194-1200.

Iciek, M. & Wlodek, L. (2001). Biosynthesis and biological properties of compounds containing highly reactive, reduced sulfane sulfur. *Pol. J. Pharmacol.* **53**, 215–225.

- James P.,** Halladay J., Craig E.A. (1996): Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics.*; **144**(4): 1425-36.
- Jaschkowitz, K., & Seidler, A.** (2000) Role of a NifS-like protein from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 in the maturation of FeS proteins. *Biochemistry* **39**, 3416–3423
- Johnson J.L. & Rajagopalan K.V.** (1982): Structural and metabolic relationship between the molybdenum cofactor and urothione. *Proc Natl Acad Sci USA*, **79**: 6856-6860.
- Johnson, J.L.,** Hainline, B.E., Rajagopalan, K.V., & Arison, B.H. (1984): The pterin component of the molybdenum cofactor. Structural characterization of two fluorescent derivatives. *J Biol Chem* **259**: 5414-5422
- Johnson, M. E., & Rajagopalan, K.V.** (1987a): *In vitro* system for molybdopterin biosynthesis. *J Bacteriol* **169**: 110-116.
- Johnson, M. E., & Rajagopalan, K.V.** (1987b): Involvement of *chlA*, *E*, *M*, and *N* Loci in *E. coli* molybdopterin biosynthesis. *J Bacteriol* **169**: 117-125.
- Johnson, J.L.,** Bastian, N.R., Rajagopalan, K.V. (1990): Molybdopterin guanine dinucleotide: A modified form of molybdopterin identified in the molybdenum cofactor of dimethyl sulfoxide reductase from *Rhodobacter phaeoides forma specialis denitrificans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 3190-3194.
- Johnson, J.L. & Wadman, S.K.** (1995). Molybdenum cofactor deficiency and isolated sulfite oxidase deficiency. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 7th edition* (Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D., eds.). pp. 2271-2283, McGraw-Hill: New York.
- Jones, R. W. & Garland, P. B.** Sites and specificity of the reaction of bipyridylum compounds with anaerobic respiratory enzymes of *Escherichia coli*. Effects of permeability barriers imposed by the cytoplasmic membrane. (1977) *Biochem. J.* **164**, 199–211.
- Joshi, M.S.,** Johnson, J.L., Rajagopalan, K.V. (1996): Molybdenum cofactor biosynthesis in *Escherichia coli mod* and *mog* mutants. *J Bacteriol.*; **178**(14): 4310-2.
- Kambampati, R., & Lauhon, C. T.** (1999) IscS is a sulfurtransferase for the in vitro biosynthesis of 4-thiouridine in *Escherichia coli* tRNA. *Biochemistry* **38**, 16561–16568
- Kambampati, R., & Lauhon, C. T.** (2000) Evidence for the transfer of sulfane sulfur from IscS to ThiI during the in vitro biosynthesis of 4-thiouridine in *Escherichia coli* tRNA. *J. Biol. Chem.* **275**, 10727–10730
- Kaur, Y.,** Ybarra, J., and Horowitz, P. M. (2004) Active rhodanese lacking nonessential sulfhydryl groups has increased hydrophobic exposure not observed in wild-type enzyme. *Protein J* **23**, 255-61.

- Kim, K.M.**, Yi, E.C., Baker, D., and Zhang, K.Y. (2001) Post-translational modification of the N-terminal His tag interferes with the crystallization of the wild-type and mutant SH3 domains from chicken src tyrosine kinase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **57**, 759-62.
- Kirsch, J.**, Wolters, I., Triller, A. & Betz, H. (1993). Gephyrin antisense oligonucleotides prevent glycine receptor clustering in spinal neurons. *Nature* **366**, pp. 745-748.
- Kirsch, J. & Betz, H.** (1998). Glycine-receptor activation is required for receptor clustering in spinal neurons. *Nature* **392**, pp. 717-720.
- Kisker C.**, Schindelin H., Pacheco A., Wehbi W.A., Garret R.M., Rajagopalan K.V., Enemark J.H., and Rees D.C. (1997): Molecular basis of sulfite oxidase deficiency from structure of sulfite oxidase. *Cell* **91**: 973-983.
- Kispal G.**, Csere P. Prohl C., Lill R. The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J.* 1999 Jul 15;**18**(14):3981-9.
- Kuper, J.**, Llamas, A., Hecht, H. J., Mendel, R. R., and Schwarz, G. (2004) Structure of the molybdopterin-bound Cnx1G domain links molybdenum and copper metabolism. *Nature* **430**, 806–806
- Laemmli KK.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680-685.
- Lake, M.W.**, Temple, C.A., Rajagopalan, K.V. & Schindelin, H. (2000). The crystal structure of the *Escherichia coli* MobA protein provides insight into molybdopterin guanine dinucleotide biosynthesis. *J Biol Chem* **275**, pp. 40211-40217.
- Land, T., Rouault, T. A.** (1998) Targeting of a human iron-sulfur cluster assembly enzyme, nifs, to different subcellular compartments is regulated through alternative AUG utilization., *Mol. Cell* **2**, 807-815.
- Lauhon, C. T., & Kambampati, R.** (2000) The *iscS* gene in *Escherichia coli* is required for the biosynthesis of 4- thiouridine, thiamin, and NAD. *J Biol Chem* **275**, 20096-103.
- Leimkühler S. & Rajagopalan K.V.** (2001): A sulfurtransferase is required in the transfer of cysteine sulfur in the *in vitro* synthesis of molybdopterin from precursor Z in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **276**: 22024-22031.
- Leimkühler, S.**, Wuebbens, M. M., and Rajagopalan, K. V. (2001) Characterization of *Escherichia coli* MoeB and its involvement in the activation of MPT synthase for the biosynthesis of the molybdenum cofactor. *J. Biol. Chem.* **276**, 34695-34701.
- Leimkühler, S.**, Freuer, A., Santamaria Araujo, J. A., Rajagopalan, K. V., and Mendel, R. R. (2003) Mechanistic studies of human molybdopterin synthase reaction and characterization of mutants identified in group B patients of molybdenum cofactor deficiency. *J Biol Chem* **278**, 26127-26134.

Lester R.L., DeMoss J.A. Effects of molybdate and selenite on formate and nitrate metabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1971 Mar;**105**(3):1006-14

Lill, R. and Kispal, G. (2000) Maturation of cellular Fe/S proteins: the essential function of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 352–356

Lill R., Mühlenhoff U. Iron-sulfur-protein biogenesis in eukaryotes. *Trends Biochem Sci.* 2005 Mar;**30**(3):133-41.

Llomas, A., Mendel, R.R., Schwarz, G. (2004) Synthesis of adenylated Molybdopterin An essential step for molybdenum insertion *J Biol Chem.* 2004 Dec 31;**279**(53):55241-6.

Ludden, P.W., et al., (1993): Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. In Stiefel EI, Coucouvanis D, Newton WE (eds) Molybdenum enzymes, cofactors, and model systems. ACS symposium series 535. Amer Chem Soc, Washington DC, pp 196-215.

Luo, G. X., and Horowitz, P. M. (1994) The sulfurtransferase activity and structure of rhodanese are affected by site-directed replacement of Arg-186 or Lys-249. *J Biol Chem* **269**, 8220-5.

Mahler, H.R., Mackler, B. and Green, D.E. (1954): Studies on metallo-flavoproteins. III. Aldehyd oxidase: a molybdoflavoprotein. *J. Biol Chem* **210**: 465-480.

Mannervik B., Axelsson K. Role of cytoplasmic thioltransferase in cellular regulation by thiol-disulphide interchange. *Biochem J.* 1980 Jul 15;**190**(1):125-30

Matunis M.J., Coutavas E., Blobel G. A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex, *J. Cell Biol.* **135** (1996) 1457–1470.

Miller-Martini, D. M., Hua, S., and Horowitz, P. M. (1994) Cysteine 254 can cooperate with active site cysteine 247 in reactivation of 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)-inactivated rhodanese as determined by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* **269**, 12414-8.

Mizushima N., Noda T., Yoshimori T., Tanaka Y., Ishii T., George M.D., Klionsky D.J., Ohsumi M., Ohsumi Y. A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature.* 1998 Sep 24;**395**(6700):395-8.

Mühlenhoff, U., Richhardt, N., Gerber, J., and Lill, R. (2002) Characterization of Iron-Sulfur Protein Assembly in Isolated Mitochondria. *J. Biol. Chem.* **277**, 29810–29816

Mühlenhoff, U., Gerber, J., Richhardt, N., and Lill, R. (2003) Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *EMBO J.* **22**, 4815–4825

Mühlenhoff, U., Balk, J., Richhardt, N., Kaiser, J. T., Sipos, K. Kispal, G. and Lill, R. (2004) Functional characterization of the eukaryotic cysteine desulfurase Nfs1p from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **279**, 36906–36915

Mueller, E.G., Palenchar, P.M. & Buck, C.J. (2001). The role of the cysteine residues of Thil in the generation of 4-thiouridine in tRNA. *J Biol Chem* **276**, pp. 33588-33595.

Nagahara, N., Okazaki, T., Nishino, T. (1995) Cytosolic mercaptopyruvate sulfurtransferase is evolutionarily related to mitochondrial rhodanese. *J. Biol. Chem.*, **270**, 16230-16235.

Nakai Y., Umeda N., Suzuki T., Nakai M., Hayashi H., Watanabe K., Kagamiyama H. Yeast Nfs1p is involved in thio-modification of both mitochondrial and cytoplasmic tRNAs. *J Biol Chem.* 2004 Mar 26;**279**(13):12363-8.

Nandi, D.L., Horowitz, P.M., and Westley, J. (2000) Rhodanese as thioredoxin oxidase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **32**, 465-473.

Nason A., Lee K.Y., Pan S.S., Ketchum P.A., Lamberti A., DeVries J. (1971): *In vitro* formation of assimilatory reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: nitrate reductase from a *Neurospora* mutant and a component of molybdenum-enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* **68**: 3232-3236.

Nicholas, D.J.D. & Nason, A. (1954): Molybdenum and nitrate reductase. II. Molybdenum as a constituent of nitrate reductase. *J. Biol. Chem.* **207**: 353-361.

Ogasawara, Y., Lacourciere, G. and Stadtman, T.C. (2001) Formation of a selenium-substituted rhodanese by reaction with selenite and glutathione: possible role of a protein perselenide in a selenium delivery system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 9494-9498.

Pagani, S., Bonomi, F., and Cerletti, P. (1984) Enzymic synthesis of the iron-sulfur cluster of spinach ferredoxin. *Eur J Biochem* **142**, 361-6.

Palenchar, P. M., Buck, C. J., Cheng, H., Larson, T. J., and Mueller, E. G. (2000) Evidence that Thil, an enzyme shared between thiamin and 4-thiouridine biosynthesis, may be a sulfurtransferase that proceeds through a persulfide intermediate. *J. Biol. Chem.* **275**, 8283-8286.

Palmer T., Vasishta A., Whitty W., Boxer D. (1994): Isolation of Protein FA, a product of the *mob* locus required for molybdenum cofactor biosynthesis in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **222**: 678-692.

Palmer T., Santini C.L., Iobbi-Nivol C., Eaves D.J., Boxer D.H., Giordano G. (1996): Involvement of the *narJ* and *mob* gene products in distinct steps in the biosynthesis of the molybdoenzyme nitrate reductase in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.*; **20**(4): 875-84.

Papenbrock, J. & Schmidt, A. (2000). Characterization of a sulfurtransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Eur. J. Biochem.* **267**, 145–154.

- Pateman J.A.**, Cove D.J., Rever B.M., Roberts D.B. (1964) A common cofactor for nitrate reductase and xanthine dehydrogenase which also regulates the synthesis of nitrate reductase. *Nature* **201**, 58-60.
- Pienkos, P.T.**, Shah, V.K., Brill, W. (1977): Molybdenum cofactors from molybdoenzymes and *in vitro* reconstitution of nitrogenase and nitrate reductase. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5468-5471.
- Pitterle D.M.**, Rajagopalan KV. (1989): Two proteins encoded at the *chlA* locus constitute the converting factor of *Escherichia coli chlA1*. *J Bacteriol.*; **171**(6): 3373-8.
- Pitterle, D.M. & Rajagopalan, K.V.** (1993). The biosynthesis of molybdopterin in *Escherichia coli*. Purification and characterization of the converting factor. *J. Biol. Chem.* **268**, pp. 13499-13505.
- Pitterle D.M.**, Johnson J.L., Rajagopalan K.V. (1993) *In vitro* synthesis of molybdopterin from precursor Z using purified converting factor. *J Biol Chem.* **262**, 13506-13509.
- Ploegman, J. H.**, Drent, G., Kalk, K. H., Hol, W. G. J., Heinrikson, R. L., Keim, P. et al. (1978). The covalent and tertiary structure of bovine liver rhodanese. *Nature*, **273**, 124–129.
- Ploegman J.H.**, Drent G., Kalk K.H., Hol W.G. The structure of bovine liver rhodanese. II. The active site in the sulfur-substituted and the sulfur-free enzyme. *J Mol Biol.* 1979 Jan 15;**127**(2):149-62.
- Rajagopalan, K.V.**, (1996): Biosynthesis of the molybdenum cofactor. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Pp. 674-679. Neidhardt. F. C., Ed., ASM Press, Washington, DC.
- Ray, W. K.**, Zeng, G., Potters, M. B., Mansuri, A. M., and Larson, T. J. (2000) Characterization of a 12-kilodalton rhodanese encoded by *glpE* of *Escherichia coli* and its interaction with thioredoxin. *J Bacteriol* **182**, 2277-84.
- Rech S.**, Deppenmeier S., Gunsalus R.P. (1995): Regulation of the molybdate transport operon, *modABCD*, of *E. coli* in response to molybdate availability. *J. Bacteriol.* **177**: 1023-1029.
- Reiss, J.** (2000). Genetics of molybdenum cofactor deficiency. *Hum Genet* **106**, pp. 157-163.
- Reiss, J.**, Gross-Hardt, S., Christensen, E., Schmidt, P., Mendel, R.R. & Schwarz, G. (2001). A Mutation in the Gene for the Neurotransmitter Receptor-Clustering Protein Gephyrin Causes a Novel Form of Molybdenum Cofactor Deficiency. *Am J Hum Genet* **68**, pp. 208-213.
- Reynolds, R.A.**, Yem, A.W., Wolfe, C.L., Deibel, M.R., Jr, Chidester, C.G. and Watenpaugh, K.D. (1999) Crystal structure of the catalytic subunit of Cdc25B required for G₂/M phase transition of the cell cycle. *J. Mol. Biol.*, **293**, 559-568.

- Romao M.J.**, Archer M., Moura I., Moura J.J., LeGall J., Engh R., Schneider M., Hof P., Huber R. (1995) Crystal structure of the xanthine oxidase-related aldehyd oxidoreductase from *D. gigas*. *Science* **270**: 1170-1176.
- Sambrook J.**, Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Santamaria-Araujo, J. A.**, Fischer, B., Otte, T., Nimtz, M., Mendel, R. R., Wray, V., and Schwarz, G. (2004) The tetrahydropyranopterin structure of the sulfur-free and metal-free molybdenum cofactor precursor. *J. Biol. Chem.* **279**, 15994–15999
- Schindelin, H.**, Kisker C., Hilton J., Rajagopalan K.V., Rees D.C. (1996): The overall fold of *Rhodobacter sphaeroides* DMSO reductase is similar to that of FDH. *Science* **272**: 1615-1619.
- Schindelin, H.**, Kisker C., Rees D.C. (1997): The molybdenum-cofactor: a cristallographic perspective. *J. Bioinorg. Chem.* **2**: 773-781.
- Schlesinger, P. & Westley, J.** (1974) An expanded mechanism for rhodanese catalysis. *J. Biol. Chem.* **249**, 780–788.
- Schwarz, G.**, Schrader, N., Mendel, R.R., Hecht, H.J. & Schindelin, H. (2001). Crystal structures of human gephyrin and plant Cnx1 G domains: comparative analysis and functional implications. *J Mol Biol* **312**, pp. 405-418.
- Sorbo, B.** (1957) Enzymic transfer of sulfur from mercaptopyruvate to sulfate or sulfinates. *Biochim Biophys Acta* **24**, 324-9.
- Sorger G.J., Giles N.H.** (1965): Genetic control of nitrate reductase in *Neurospora crassa*. *Genetics* **52**: 777-788
- Spallarossa, A.**, Donahue, J. L., Larson, T. J., Bolognesi, M., and Bordo, D. (2001) Escherichia coli GlpE is a prototype sulfurtransferase for the single-domain rhodanese homology superfamily. *Structure (Camb)* **9**, 1117-25.
- Stallmeyer, B.**, Drugeon, G., Reiss, J., Haenni, A.L. & Mendel, R.R. (1999a). Human molybdopterin synthase gene: identification of a bicistronic transcript with overlapping reading frames. *Am. J. Hum. Genet.* **64**, pp. 698-705.
- Stallmeyer, B.**, Schwarz, G., Schulze, J., Nerlich, A., Reiss, J., Kirsch, J. & Mendel, R.R. (1999b). The neurotransmitter receptor-anchoring protein gephyrin reconstitutes molybdenum cofactor biosynthesis in bacteria, plants, and mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, pp. 1333-1338.
- Stein I.**, Peleg Y., Even-Ram S., Pines O. The Single Translation Product of the FUM1 Gene (Fumarase) Is Processed in Mitochondria before Being Distributed between the Cytosol and Mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae* *Mol Cell Biol.* 1994 Jul;**14**(7):4770-8.

Studier F.W., Moffatt B.A. (1986): Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.* **189**(1): 113-30.

Temple C.A., Graf T.N., Rajagopalan K.V. (2000) Optimization of expression of human sulfite oxidase and its molybdenum domain. *Arch Biochem Biophys.* 383, 281-287.

Tong W.H., Jameson G.N., Huynh B.H., Rouault T.A. Subcellular compartmentalization of human Nfu, an iron-sulfur cluster scaffold protein, and its ability to assemble a [4Fe-4S] cluster. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Aug 19;**100**(17):9762-7.

Toohey, I. J. (1989). Sulphane sulphur in biological systems: a possible regulatory role. *Biochem. J.* **264**, 625–632.

Ungermann C., Neupert W., Cyr D.M. (1994) The role of Hsp70 in conferring unidirectionality on protein translocation into mitochondria. *Science.* 1994 Nov 18;**266**(5188):1250-3

Varshavsky, A. (1997). The ubiquitin system. *Trends Biochem Sci* **22**, pp. 383-387.

Weng, L., Russell, J., and Heinrikson, R. L. (1978) The covalent structure of bovine liver rhodanese. NH₂-terminal sequence and partial structural analysis of tryptic peptides from the citraconylated protein. *J Biol Chem* **253**, 8093-101.

Westerfeld, W.W., Reichert, D.A. (1949): A new dietary factor related to xanthine oxidase. *Science* **109**: 68.

Westley, J. (1973) Rhodanese. *Adv. Enzymol.* **39**, 327-368.

Westley A.M., Westley J.: Biological sulfane sulfur. *Anal. Biochem.*, 1991, **195**, 63–67

Westley, J., Adler, H., Westley, L., and Nishida, C. (1983) The sulfurtransferases. *Fundam Appl Toxicol* 3, 377-82.

Westley, J. (1989) Depletion of the sulphane pool: toxicological implications. In Damiani, L.A. (ed.), Sulphur-Containing Drugs and Related Organic Compounds, Vol. 2B. J. Wiley & Sons, New York, NY, pp. 87-99.

Xi, J., Ge, Y., Kinsland, C., McLafferty, F. & Begley, T. P. (2001) Biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin in *Escherichia coli*: identification of an acyldisulfide-linked protein–protein conjugate that is functionally analogous to the ubiquitin/E1 complex *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 8513–8518.

6. Anhang

6.1 Plasmide

Tab.6.1: Liste der in dieser Arbeit erstellen Plasmide

Bezeichnung	Referenz	Verwendung
pSL206	Leimkühler <i>et al.</i> , 2003	Coexpression MOCS2A, MOCS2B, MOCS3
pSL206-C412A	Diese Arbeit	s.o. MOCS3-C412A
pSL206-C239A	Diese Arbeit	s.o. MOCS3-C239A
pMW15eB	Leimkühler <i>et al.</i> , 2001	Expression MoeB
pMW15eB-C187A	Leimkühler <i>et al.</i> , 2001	Expression MoeB-C187A
pGBKT7-MOCS3	Diese Arbeit	MOCS3 mit N-terminales DNA-BD für Two-Hybrid
pCal-n-MOCS3	Diese Arbeit	Expression von MOCS3 mit N-terminalem Calmodulin bindendem Peptid
pGEX-6P-1-MOCS3	Diese Arbeit	Expression MOCS3 mit N-terminaler GST-Fusion
pPICZ-MOCS3	Diese Arbeit	Expression MOCS3 in <i>P. pastoris</i>
pEGFP-N2-MOCS3	Diese Arbeit	MOCS3 mit C-terminalem GFP-Tag für Lokalisierung
pEGFP-N2-MOCS2A	Diese Arbeit	MOCS2A mit C-terminalem GFP-Tag für Lokalisierung
pEGFP-N2-MOCS2B	Diese Arbeit	MOCS2B mit C-terminalem GFP-Tag für Lokalisierung
pEGFP-C2-MOCS3	Diese Arbeit	MOCS3 mit N-terminalem GFP-Tag für Lokalisierung
pEGFP-C2-MOCS2A	Diese Arbeit	MOCS2A mit C-terminalem GFP-Tag für Lokalisierung
pEGFP-C2-MOCS2B	Diese Arbeit	MOCS2B mit C-terminalem GFP-Tag für Lokalisierung
pcDNA3-flagMOCS3	Diese Arbeit	MOCS3 mit C-terminalem Flag-Tag für Lokalisierung
pET15b-MOCS3-MoeBD	Diese Arbeit	Expression MOCS3 Δ 303-460 mit N-terminalem His ₆ Tag
pET15b-MoeB-MOCS3-RLD	Diese Arbeit	Expression von einem Fusionsprotein aus <i>E.coli</i> MoeB und MOCS3 Δ 1-302
pET15b-MOCS3-RLD	Diese Arbeit	Expression von MOCS3 Δ 1-302 mit N-terminalem His ₆ Tag
pET15b-MOCS3-RLD-C412A	Diese Arbeit	Expression von MOCS3 Δ 1-302-C412A mit N-terminalem His ₆ Tag
pET15b-MOCS3-RLD-C316A	Diese Arbeit	Expression von MOCS3 Δ 1-302-C316A mit N-terminalem His ₆ Tag
pET15b-MOCS3-RLD-C324A	Diese Arbeit	Expression von MOCS3 Δ 1-302-C324A mit N-terminalem His ₆ Tag
pET15b-MOCS3-RLD-C365A	Diese Arbeit	Expression von MOCS3 Δ 1-302-C365A mit N-terminalem His ₆ Tag
pET15b-MOCS3-RLD-C316A/C324A	Diese Arbeit	Expression von MOCS3 Δ 1-302-C316A/C324A mit N-terminalem His ₆ Tag
pET15b-MOCS3-RLD-C316A/C324A/C365A	Diese Arbeit	Expression von MOCS3 Δ 1-302-C316A/C324A/C365A mit N-terminalem His ₆ Tag
pQE80-NFS1	Diese Arbeit	Expression von NFS1 mit N-terminalem His ₆ Tag
pQE80-NFS1 Δ 35	Diese Arbeit	Expression von NFS1 Δ 35 mit N-terminalem His ₆ Tag
pQE80-NFS1 Δ 60	Diese Arbeit	Expression von NFS1 Δ 60 mit N-terminalem His ₆ Tag
pPH67	Leimkühler <i>et al.</i> , 2003	Expression GroES/EL
pGAD426huNFS1 Δ 35F ₁ β	Diese Arbeit	Expression von NFS1 Δ 35 mit N-terminaler Mitochondrien-Targeting Sequenz aus <i>N. crassa</i> in <i>S. cerevisiae</i>

6.2 Primer

Tab. 6.2: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Primer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Verwendung
Mocs3BamHI 5'	gga tcc aga tgg ctt ccc ggg agg	Klonierung MOCS3 in pGEX-6P-1
Mocs3SalI 3'	gtc gac tca gta ctg tgg aaa tgt tcc	Klonierung MOCS3 in pGEX-6P-1
Mocs3BamHI 5'	gga tcc aga tgg ctt ccc ggg agg	Klonierung MOCS3 in pCal-n
Mocs3SalI 3'	gtc gac tca gta ctg tgg aaa tgt tcc	Klonierung MOCS3 in pCal-n
Mocs3BamHI 3'	gga tcc tca gta ctg tgg aaa tgt tcc	Klonierung MOCS3 in pGBKT7
Mocs3BgIII 3'	aga tct tca gta ctg tgg aaa tgt tcc	Klonierung MOCS3 in pGBKT7
Mocs3QE60NcoI 5'	cca tgg ctt ccc ggg agg agg tac tgc cc	Klonierung MOCS3 in pQE60
Mocs3QE60BamHI 10.S. 3'	gga tcc gta ctg tgg aaa tgt tcc atc g	Klonierung MOCS3 in pQE60
5' Mocs3HindRBS	ca agc tta gaa gga gat ata cca tgg ctt ccc ggg agg agg	Klonierung von pSL206-C412A
3' Mocs3HindIII	aag ctt tca gta ctg tgg aaa tgt tcc	Klonierung von pSL206-C412A
C239A 5'	cag tga cca acg ccg cgg acg gcg	Klonierung von pSL206-C239A
MOCS3C293A	c gcc agc aca gct gcg tca tta acc	Klonierung von pSL206-C239A
M3PaA ₁ hol5	cgc tgc agc atg gct tcc cgg gag gag gta c	Klonierung von MOCS3 in pPICZ
M3PaA ₁ NotI3	cgg ccg ccg cgt act gtg gaa atg ttc cat cg	Klonierung von MOCS3 in pPICZ
Mocs35' SalI	gtc gac tca tgg ctt ccc ggg agg agg	Klonierung von MOCS3 in pEGFP-N2
Mocs3BamHI 10.S. 3'	gga tcc agt act gtg gaa atg ttc cat cg	Klonierung von MOCS3 in pEGFP-N2
Mocs35' SalI	gtc gac tca tgg ctt ccc ggg agg agg	Klonierung von MOCS3 in pEGFP-C2
Mocs33' BamHI	gga tcc atc agt cct gtg gaa atg ttc c	Klonierung von MOCS3 in pEGFP-C2
Mocs2a5' EcoRI	gaa ttc atg gtg ccg ctg tgc cag g	Klonierung von MOCS2A in pEGFP-N2
Mocs2a3' BamHI 10.S.	gga tcc act atc ctc cac taa tgg g	Klonierung von MOCS2A in pEGFP-N2
Mocs2a5' EcoRI	gaa ttc atg gtg ccg ctg tgc cag g	Klonierung von MOCS2A in pEGFP-C2
Mocs2a3' BamHI	gga tcc atc ctc cac taa tgg ggg gg	Klonierung von MOCS2A in pEGFP-C2
Mocs2b5' EcoRI	gaa ttc atg tgc agc ttg gag atc agc	Klonierung von MOCS2B in pEGFP-N2
Mocs2b3' BamHI 10.S.	gga tcc aac tgt tgg atg ccc aaa agc	Klonierung von MOCS2B in pEGFP-N2
Mocs2b5' EcoRI	gaa ttc atg tgc agc ttg gag atc agc	Klonierung von MOCS2B in pEGFP-C2
Mocs2b3' BamHI	gga tcc att aac tgt tgg atg ccc aaa	Klonierung von MOCS2B in pEGFP-C2
Mocs3Flag5'	gat cct gga cta caa gga cga cga caa gtg acg atc gg	Klonierung von MOCS3 in pcDNA3-flag
Mocs3Flag3'	aat tcc gat cgt cac ttg tgc tgc tcc ttg tag tcc ag	Klonierung von MOCS3 in pcDNA3-flag
Mocs3OINcoI 5'	cca tgg gca agg ccg ctc tgt ccc gag	Klonierung von MOCS3Δ303-460 in pET15b
Mocs3MoeBE. BamHI 3'	gga tcc tca ttc ccc gca agc tgc aca gtc g	Klonierung von MOCS3Δ303-460 in pET15b
Mocs3RDNdeI 5'	cat atg ccg ccc act ctg act gat ctg c	Klonierung von MOCS3Δ1-302 in pET15b
Mocs3C316A5'	gaa gcc ttc gct ggc tcc tca gc	Mutagenese C316A
Mocs3C324A5'	gcc act gat aaa gcc cgc tcc ctg c	Mutagenese C324A
Mocs3C365A5'	gga ggt gga cat tgc tgc ttt gcc tc	Mutagenese C365A
Mocs3C412A5'	ccc agt ttg gca atc aca taa atg g	Mutagenese C412A
Mocs3 SEQ1	ggc cgc ctt ggc ctt gtg gac tat gac g	Sequenzierung MOCS3
Mocs3 SEQ2	gct atc gct gca tat tcc ccc aac cac c	Sequenzierung MOCS3
Mocs3 SEQ3	gtc ccc att tat gtg att tgc	Sequenzierung MOCS3
Mocs3 SEQ4	gct gtc cgt gca cgc cca gc	Sequenzierung MOCS3
5BamIscS	gcg gat cca tgc tgc tcc gag ccg c	Klonierung von Nfs1 in pQE80
3HindIscS	gca agc ttc tag tgt tgg gtc cac	Klonierung von Nfs1 in pQE80
35NFS5' BamHI	gcg gat cca tgc gtg ctc ctc agt c	Klonierung von Nfs1Δ35 in pBSCM13F ₁ β
NFS1xho1 3'	cgc tgc agc tag tgt tgg gtc cac	Klonierung von Nfs1Δ35 in pBSCM13F ₁ β
MoeBNcoI 5'	cca tgg gca tgg ccg aac tca gcg	Klonierung von MoeB-MOCS3-RLD in pET15b
MoeBNdeI 3'	cat atg ctg ccc aca cac ctc aca cc	Klonierung von MoeB-MOCS3-RLD in pET15b

Zusammenfassung

Die universelle Funktion des Molybdäncofaktors (Moco) zeigt sich in seiner hochkonservierten Struktur als essentieller Bestandteil aller, mit Ausnahme der Nitrogenase, beschriebenen Molybdoenzyme. Die Biosynthese des Cofaktors ist in allen Organismenreihen konserviert und kann in drei Grund-Schritte unterteilt werden. Ausgehend von GTP wird die schwefelfreie Pterinverbindung Precursor Z hergestellt. Die Einführung einer Dithiolengruppe durch die MPT-Synthase schließt die Synthese des Molybdopterin (MPT) ab, der organischen Komponente des Cofaktors. MPT wird im letzten Schritt durch die Komplexbildung des Molybdän-Atoms in aktiven Moco umgewandelt. Die MPT-Synthase liegt in der Zelle als Heterotetramer vor und besteht im Menschen aus zwei MOCS2A- und zwei MOCS2B-Untereinheiten. Der Schwefel zur Bildung von MPT aus Precursor Z liegt in Form einer Thiocarboxylat-Gruppe am C-Terminus von MOCS2A vor. Zur Regenerierung der Thiocarboxylat-Gruppe nach Bildung der Dithiolen-Gruppe wird der C-Terminus von MOCS2A durch Bildung einer Acyl-Adenylat-Gruppe aktiviert, bevor der Schwefel übertragen werden kann. Aus Arbeiten in *Escherichia coli* ist bekannt, dass die Adenylierung durch das Protein MoeB und die anschließende Sulfurierung durch bisher nicht eindeutig identifizierte Sulfurtransferasen katalysiert wird.

Gegenstand dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung des humanen MoeB-homologen Proteins MOCS3, welches über eine zusätzliche C-terminale Rhodanese-ähnliche Domäne verfügt. Rhodanesen sind charakterisiert als Schwefel-transferierende Proteine, die *in vitro* Schwefel von Thiosulfat auf Cyanid übertragen, ihre physiologische Funktion ist bisher unbekannt. Nach Reinigung der separaten Rhodanese-ähnlichen Domäne von MOCS3 konnte gezeigt werden, dass diese in der Lage ist, den Schwefel für die Thiocarboxylierung von MOCS2A bereit zu stellen. Dies war der erste Beweis eines physiologischen Substrates eines Rhodanese-ähnlichen Proteins im Menschen. Gerichtete Mutagenesen an Cystein-Resten der Rhodanese-Domäne zeigten, dass Cys-412 essentiell für die Sulfurtransferase-Aktivität ist, eine direkte Beteiligung von drei weiteren Cystein-Resten am Schwefeltransfer Mechanismus konnte ausgeschlossen werden. Die Ausbildung einer Persulfid-Gruppe am katalytisch aktiven Cys-412 konnte direkt durch massenspektroskopische Untersuchungen nachgewiesen werden. Gerichtete Mutagenese in der MoeB-Domäne von MOCS3 gaben Hinweise auf die Beteiligung von Cys-239 an der Schwefeltransfer-Reaktion. Es konnte ein Modell zur Thiocarboxylierung von MOCS2A durch MOCS3 aufgestellt werden. Nach der Adenylierung von MOCS2A durch MOCS3 wird der Schwefel unter Ausbildung einer transienten Disulfid-Brücke vom persulfurierten Cys-412 in der Rhodanese-Domäne auf MOCS2A übertragen. Die Disulfid-Brücke wird reduktiv durch Cys-239 in MOCS3 gespalten und thiocarboxyliertes MOCS2A wird freigesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass Thiosulfat *in vitro* als Schwefelquelle für diese Reaktion fungieren kann, jedoch konnte der *in vivo* Schwefeldonor noch nicht eindeutig identifiziert werden.

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank meiner Mentorin Prof. Dr. Silke Leimkühler, die mich mit diesem spannenden Projekt betraut hat. Für das Vertrauen, die überlassenen Freiräume und die uneingeschränkte Unterstützung während der gesamten Promotion.

Herrn Prof. Dr. Ralf-R. Mendel danke ich für die das Interesse an meiner Arbeit und die ständige Unterstützung, welche ich seit meinem Studium erfahren habe.

Ein besonderer Dank gilt Andrea Freuer, deren Freundschaft mir auch in schwierigeren Zeiten immer eine Hilfe war und dafür sorgte, dass mir die Freude an der Arbeit nie verloren ging.

Bei Gerrit Gutzke, Jochen Kuper und Jennifer Schmitz möchte ich mich für die Freundschaft und Verlässlichkeit bedanken. Meiner Diplomandin Inga Preuss und meinen Praktikantinnen Heike und Merle danke ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit und allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke ich für das herzliche, sehr gute Arbeitsklima und die freundschaftliche Atmosphäre.

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinem Vater, meinem Bruder, Inge und meinen Omi's für die grenzenlose Unterstützung in allen erdenklichen Belangen bedanken und dass sie jederzeit für mich da waren.

Zuletzt möchte ich der wichtigsten Person danken, ohne deren liebevolle Unterstützung diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre, meiner Freundin Anneke Lühr.